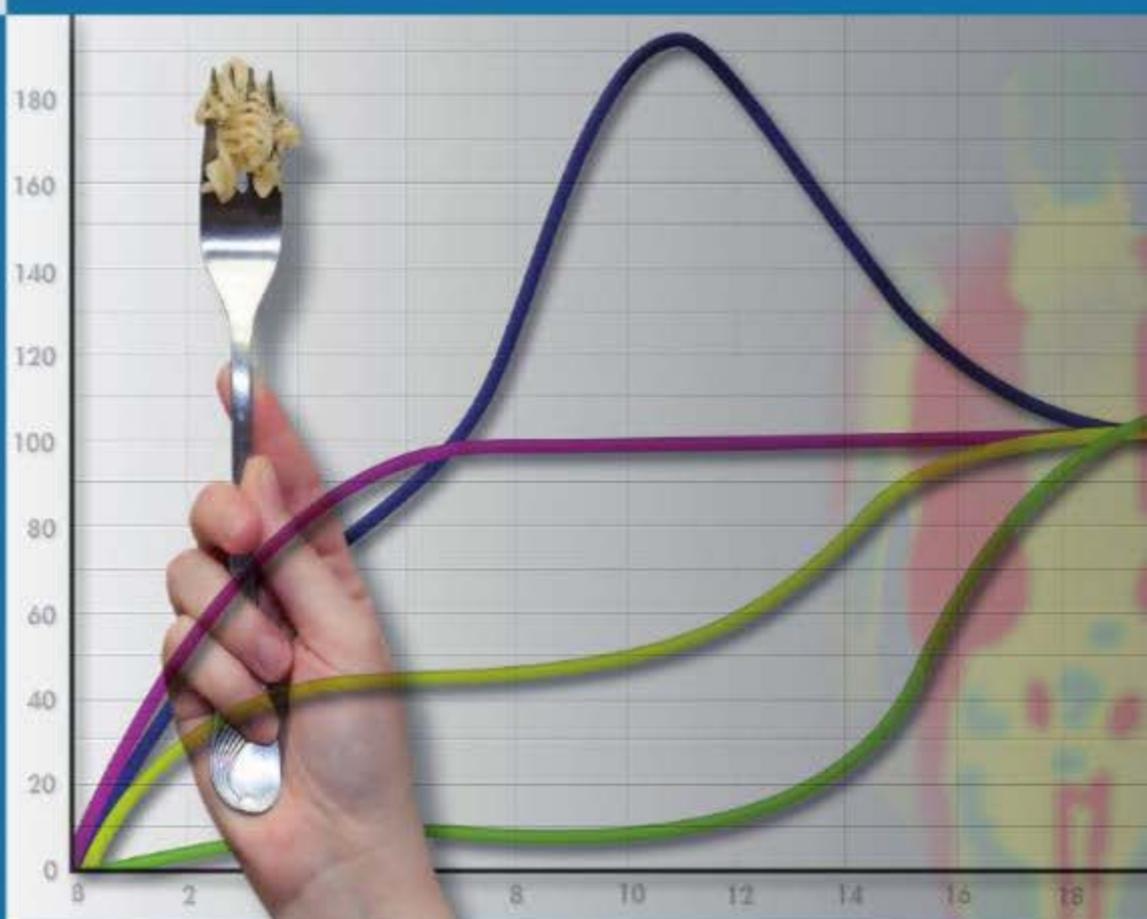


Martínez • Portillo

Fundamentos de Nutrición y Dietética

*Bases metodológicas
y aplicaciones*



EDITORIAL MEDICA
panamericana

FUNDAMENTOS DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

Bases metodológicas y aplicaciones

FUNDAMENTOS DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

Bases metodológicas y aplicaciones

DIRECTORES

J. ALFREDO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

Catedrático de Nutrición y Bromatología. Director del Instituto de Ciencias de la Alimentación.
Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología.
Universidad de Navarra. Pamplona. Navarra.

MARÍA DEL PUY PORTILLO BAQUEDANO

Catedrática de Nutrición y Bromatología. Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos.
Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Vitoria. Álava.

COORDINADOR

SANTIAGO NAVAS CARRETERO

Investigador. Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología.
Universidad de Navarra, Pamplona. Navarra.



BUENOS AIRES - BOGOTÁ - CARACAS - MADRID - MÉXICO - PORTO ALEGRE
www.medicapanamericana.com

Los editores han hecho todos los esfuerzos para localizar a los poseedores del copyright del material fuente utilizado. Si inadvertidamente hubieran omitido alguno, con gusto harán los arreglos necesarios en la primera oportunidad que se les presente para tal fin.

Gracias por comprar el original. Este libro es producto del esfuerzo de profesionales como usted, o de sus profesores, si usted es estudiante. Tenga en cuenta que fotocopiarlo es una falta de respeto hacia ellos y un robo de sus derechos intelectuales.

Las ciencias de la salud están en permanente cambio. A medida que las nuevas investigaciones y la experiencia clínica amplían nuestro conocimiento, se requieren modificaciones en las modalidades terapéuticas y en los tratamientos farmacológicos. Los autores de esta obra han verificado toda la información con fuentes confiables para asegurarse de que ésta sea completa y acorde con los estándares aceptados en el momento de la publicación. Sin embargo, en vista de la posibilidad de un error humano o de cambios en las ciencias de la salud, ni los autores, ni la editorial o cualquier otra persona implicada en la preparación o la publicación de este trabajo, garantizan que la totalidad de la información aquí contenida sea exacta o completa y no se responsabilizan por errores u omisiones o por los resultados obtenidos del uso de esta información. Se aconseja a los lectores confirmarla con otras fuentes. Por ejemplo, y en particular, se recomienda a los lectores revisar el prospecto de cada fármaco que planean administrar para cerciorarse de que la información contenida en este libro sea correcta y que no se hayan producido cambios en las dosis sugeridas o en las contraindicaciones para su administración. Esta recomendación cobra especial importancia con relación a fármacos nuevos o de uso infrecuente.



Visite nuestra página web:
<http://www.medicapanamericana.com>

ARGENTINA

Marcelo T. de Alvear 2.145 (C 1122 AAG)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina
Tel.: (54-11) 4821-2066 / Fax: (54-11) 4821-1214
e-mail: info@medicapanamericana.com

COLOMBIA

Carrera 7a A N° 69-19 - Bogotá DC - Colombia.
Tel.: (57-1) 235-4068 / Fax: (57-1) 345-0019
e-mail: infomp@medicapanamericana.com.co

ESPAÑA

Alberto Alcocer, 24 - 6.º piso - 28036 Madrid, España
Tel.: (34-91) 1317800 / Fax: (34-91) 1317805
e-mail: info@medicapanamericana.es

MÉXICO

Hegel 141, 2.º piso, Colonia Chapultepec Morales
Delegación Miguel Hidalgo - 11570 - México D.F., México
Tel.: (52-55) 5262-9470/5203-0176 / Fax: (52-55) 2624-2827
e-mail: infomp@medicapanamericana.com.mx

VENEZUELA

Edificio Polar, Torre Oeste, Piso 6, Of. 6-C
Plaza Venezuela, Urbanización Los Caobos,
Parroquia El Recreo, Municipio Libertador - Caracas Depto. Capital -
Venezuela
Tel.: (58-212) 793-2857/6906/5985/1666
Fax: (58-212) 793-5885
e-mail: info@medicapanamericana.com.ve

ISBN: 978-84-9835-397-6 (versión impresa)

ISBN: 978-84-9835-640-3 (versión electrónica)



Todos los derechos reservados. Este libro o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos ni archivados en sistemas recuperables, ni transmitidos en ninguna forma o por ningún medio, ya sean mecánicos, electrónicos, fotocopiadoras, grabaciones o cualquier otro, sin el permiso previo de Editorial Médica Panamericana, S. A.

© 2011, EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA, S. A.

Alberto Alcocer, 24 - 28036 Madrid

Impreso en España

Índice de autores

Abete Goñi, Itziar

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Alegre Martínez, Estibaliz

Servicio de Bioquímica. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona.

Ansorena Artieda, Diana

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Astiasarán Anchia, Iciar

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Bald Garmendia, Carlos

AZTI-Tecnalia. Unidad de Investigación Alimentaria. Derio. Vizcaya.

Bondia Pons, Isabel

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Boqué Terre, Noemí

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Campión Zabalza, Javier

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Churruca Ortega, Itziar

Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Vitoria. Álava.

Cordero Sánchez, Paúl

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Crujeiras Martínez, Ana B.

Departamento de Endocrinología Molecular y Celular. Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. A Coruña.

Cuervo Zapatel, Marta

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Instituto de Ciencias de la Alimentación. Universidad de Navarra. Pamplona.

De la Iglesia González, Rocío

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Díaz-Lagares, Ángel

Unidad de Medicina Molecular, Fundación Pública Gallega de Medicina Genómica. Santiago de Compostela. A Coruña.

Díaz Prieto, Ligia Esperanza

Departamento de Metabolismo y Nutrición. Instituto del Frío-ICTAN. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Madrid.

Diez López, Ignacio

Servicio de Pediatría Hospital Txagorritxu.
Vitoria. Álava.

Fanjul González, Carmen

Departamento de Ciencias de la Alimentación,
Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra.
Pamplona.

Fernández-Galilea, Marta

Departamento de Ciencias de la Alimentación,
Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra.
Pamplona.

Fernández-Quintela, Alfredo

Departamento de Farmacia y Ciencias
de los Alimentos. Facultad de Farmacia.
Universidad del País Vasco. Vitoria. Álava.

Galbete Ciaurriz, Cecilia

Departamento de Ciencias de la Alimentación,
Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra.
Pamplona.

García de Diego, Laura

Instituto de Ciencias de la Alimentación.
Departamento de Ciencias de la Alimentación.
Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra.
Pamplona.

García-Díaz, Diego

Departamento de Ciencias de la Alimentación,
Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra.
Pamplona.

Gómez-Úriz, Ana M.

Departamento de Ciencias de la Alimentación,
Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra.
Pamplona.

Gómez-Martínez, Sonia

Departamento de Metabolismo y Nutrición.
Instituto del Frío-ICTAN. Consejo Superior
de Investigaciones Científicas (CSIC). Madrid.

González Hernández, Álvaro

Servicio de Bioquímica. Clínica Universidad
de Navarra. Pamplona.

González, Andrea

Departamento de Nutrición, Diabetes
y Metabolismo. Facultad de Medicina.

Pontificia Universidad Católica de Chile.
Santiago de Chile.

González-Muniesa, Pedro

Departamento de Ciencias de la Alimentación,
Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra.
Pamplona.

Goyenechea Soto, Estíbaliz

Instituto BioDonostia. Hospital Donostia.
San Sebastián. Guipuzcoa.

Hermisdorff, Helen H. M.

Departamento de Ciencias de la Alimentación,
Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra.
Pamplona.

Hernández Ruiz de Eguilaz, María

Departamento de Ciencias de la Alimentación,
Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra.
Pamplona.

Labayen Goñi, Idoia

Departamento de Farmacia y Ciencias
de los Alimentos. Facultad de Farmacia.
Universidad del País Vasco. Vitoria. Álava.

Lacasa Arregui, Carlos

Servicio de Farmacia. Clínica Universidad
de Navarra. Pamplona.

Lasa Elgezua, Arrate

Departamento de Farmacia y Ciencias
de los Alimentos. Facultad de Farmacia.
Universidad del País Vasco. Vitoria. Álava.

López Guzmán, José

Departamento de Humanidades Biomédicas.
Universidad de Navarra. Pamplona.

López-Legarrea, Patricia

Departamento de Ciencias de la Alimentación,
Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra.
Pamplona.

Lorente-Cebrián, Silvia

Lipid Laboratory. Department of Medicine
Huddinge. Karolinska Institutet.
Estocolmo. Suecia.

Lostao Crespo, M. Pilar

Departamento de Ciencias de la Alimentación,
Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra.
Pamplona.

Macarulla Arenaza, M. Teresa

Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Vitoria. Álava.

Marcos Sánchez, Ascensión

Departamento de Metabolismo y Nutrición. Instituto del Frío-ICTAN. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Madrid.

Marcos-Gómez, Beatriz

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Marqués Feliù, María

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Navarra. Pamplona.

Martí del Moral, Amelia

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Martínez de Morentin Aldabe, Blanca E.

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Martínez Hernández, J. Alfredo

Director del Instituto de Ciencias de la Alimentación. Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Martínez-González, Miguel Ángel

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Navarra. Pamplona.

Milagro Yoldi, Fermín I.

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Miranda Gómez, Jonatan

Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Vitoria. Álava.

Moleres Villares, Adriana

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Monreal Marquiegui, J. Ignacio

Servicio de Bioquímica, Clínica Universidad de Navarra. Pamplona.

Moreno-Aliaga, M. Jesús

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Moreno Rello, Juan Antonio

Soria N. Soria. Castilla-León.

Mugueta Uriaque, M. Carmen

Servicio de Bioquímica. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona.

Navarro Santamaría, Virginia

Área de Nuevos Alimentos. Unidad de Investigación Alimentaria. AZTI Tecnalia. Derio. Vizcaya.

Navas-Carretero, Santiago

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Peré Ceballos, Gabriela

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Pérez-Diez, Salomé

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Pérez-Matute, Patricia

Enfermedades Infecciosas: Sección VIH y alteraciones metabólicas asociadas. Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR). Logroño. La Rioja.

Portillo Baquedano, María del Puy

Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Vitoria. Álava.

Prieto-Hontoria, Pedro L.

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Quintero del Rivero, Pablo

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Rendo-Urteaga, Tara

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Rodríguez Rivera, Víctor Manuel

Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Vitoria. Álava.

Romeo Marín, Javier

Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto del Frío-ICTAN. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Madrid.

Russolillo Femenías, Giuseppe

Asociación Española de Dietistas y Nutricionistas (AEDN). Barcelona.

Sánchez Campayo, Elena

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Sánchez Villegas, Almudena

Departamento de Ciencias Clínicas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. Islas Canarias.

Santiago Neri, Susana

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Instituto de Ciencias de la Alimentación. Universidad de Navarra. Pamplona.

Santos Martín, José Luis

Departamento de Nutrición. Diabetes y Metabolismo. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile.

Sayón-Orea, Carmen

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Navarra. Pamplona.

Simón Magro, Edurne

Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Vitoria. Álava.

Solomon Edwards, Andrew

Gestión de Proyectos Europeos. Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Pamplona. Navarra.

Torres Villanueva, M. Isabel

Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Vitoria. Álava.

Valdecantos Jiménez de Andrade, Pilar

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Varo Cenarruzabeitia, Nerea

Servicio de Bioquímica. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona.

Zabala Letona, Amaia

Unidad de Biología Celular y Células Madre (Laboratorio 3, Citogenómica). CICbioGUNE. Derio. Vizcaya.

Zabala Navó María

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Zazpe García, Itziar

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Zubieta Satrústegui, M. Iosune

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Instituto de Ciencias de la Alimentación. Universidad de Navarra. Pamplona.

Zulet Alzórriz, M. Ángeles

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Prefacio

Las publicaciones sobre temas de Nutrición y Dietética han experimentado un importante auge en las últimas décadas, evidenciando la importancia que tiene la alimentación sobre la salud. De hecho, la educación nutricional y la formación en temas de dietética constituyen un reto para el profesional sanitario, ya que debe proporcionar información rigurosa, veraz y práctica al consumidor, al paciente y a la población en general.

Este libro se divide en dos grandes partes, la primera recoge los fundamentos teóricos y la segunda los métodos y aplicaciones de los mismos en el contexto de la Nutrición y Dietética. Los capítulos de la primera parte incluyen textos dedicados a la composición y análisis de los alimentos, el metabolismo de nutrientes y energético, las ingestas de referencia, la nutrición en diferentes etapas de la vida y la evaluación del estado nutricional. También se aborda las interacciones entre fármacos y nutrientes y la aplicación del método científico en la investigación en nutrición. Todo ello enriquecido con abundante material gráfico.

La segunda parte dedicada a la descripción de las sesiones prácticas se divide en cinco secciones: Utilización de nutrientes, Evaluación nutricional, Nutrición humana y dietética, Investigación en nutrición y Elementos de aplicación en nutrición y dietética. En esta parte se revelan aspectos punteros de nutrigenómica, nutrigenética o metabolómica, e incluye métodos clásicos enfocados desde una óptica innovadora.

Los directores desean agradecer sinceramente el esfuerzo de los 75 autores de las sesiones prácticas por su solidaria contribución en la preparación de la presente obra. Estos capítulos, a pesar de las dificultades para una completa armonización en su estructura, por su diversa naturaleza y características, se presentan mayoritariamente, pero no exclusivamente, con los siguientes apartados: Introducción, Objetivos, Procedimiento (fundamento, materiales y métodos y protocolo), Bibliografía, Presentación de resultados y Comentarios. Los autores de estas secciones prácticas son, en su mayor parte docentes en las Universidades de Navarra y del País Vasco, aunque también se ha contado con la colaboración puntual de autores de prestigiosos centros de investigación de España, así como de otros países; todos han sido escogidos por sus específicos conocimientos y experiencia en aquellas sesiones en las que son respon-

sables tanto de sus contenidos y desarrollo, como de la selección de equipos, reactivos y procedimientos.

Los directores también desean agradecer la desinteresada aportación de los distintos autores implicados en esta obra, y especialmente a Santiago Navas-Carretero por sus labores de coordinación, así como a la Cátedra Pascual-Universidad de Navarra, por el apoyo científico y económico para que esta edición resulte de interés para el lector.

Esta obra se ha preparado, en definitiva, para cubrir las demandas de un nutrido grupo de profesionales de la salud, docentes e investigadores, estudiantes y graduados, así como aquellos colectivos interesados en conocer los fundamentos de Nutrición y Dietética con una perspectiva del siglo XXI.

Alfredo Martínez y M.^a del Puy Portillo

Índice de capítulos

PARTE I. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1. Ciencias de la alimentación	3
2. Composición de los alimentos	11
3. Utilización nutritiva de los alimentos.....	17
4. Balance energético: peso y composición corporal.....	35
5. Nutrición y recomendaciones dietéticas.....	45
6. Nutrición humana.....	51
7. Nutrición y estado nutricional.....	69
8. Interacciones entre fármacos y nutrientes.....	79
9. Investigación en nutrición: métodos para el estudio de la utilización y funciones de los nutrientes.....	85
10. Diseño y análisis estadístico en estudios de nutrición	99
BIBLIOGRAFÍA.....	113

PARTE II. METODOLOGÍA Y APLICACIONES

Sección 1. Utilización de nutrientes

1. Determinación de la energía bruta de un alimento mediante bomba calorimétrica adiabática.....	119
<i>P. Quintero del Rivero y F. I. Milagro Yoldi</i>	
2. Digestión de nutrientes: amilasa salival.....	123
<i>B. Marcos-Gómez y M. J. Moreno-Aliaga</i>	
3. Absorción intestinal de azúcares	127
<i>C. Fanjul González y M. P. Lostao Crespo</i>	
4. Determinación del índice glucémico de los alimentos.....	133
<i>I. Díez López y M. T. Macarulla Arenaza</i>	
5. Valoración del gluten en los alimentos.....	137
<i>E. Simón Magro</i>	

6. Adipocitos y adipocinas: cultivo primario de adipocitos de rata.....	145
<i>P. Pérez-Matute, S. Lorente-Cebrián y M. J. Moreno-Aliaga</i>	
7. Determinación de la actividad lipolítica <i>in vitro</i>	151
<i>A. Lasa Elgezua y M. P. Portillo Baquedano</i>	
8. Capacidad lipogénica.....	157
<i>A. Zabala Letona y M. P. Portillo Baquedano</i>	
9. Metabolismo hepático del colesterol.....	163
<i>V. Navarro Santamaría y M. P. Portillo Baquedano</i>	
10. Influencia de la fibra sobre el nivel de colesterol en hígado y heces.....	171
<i>N. Boqué Terre y M. A. Zulet Alzórriz</i>	
11. Evaluación de la calidad nutritiva de las proteínas: índices químicos e índices biológicos.....	175
<i>M. T. Macarulla Arenaza y M. P. Portillo Baquedano</i>	
12. Aminoácidos en alimentos destinados a población con aminoacidopatías.....	183
<i>A. Fernández-Quintela y E. Simón Magro</i>	
13. Alcoholemia como índice de consumo.....	189
<i>M. I. Torres Villanueva, D. Ansorena Artieda e I. Astiasarán Anchia</i>	
14. Efecto de la ingesta de agua y minerales en la regulación del equilibrio hidroelectrolítico.....	195
<i>M. T. Macarulla Arenaza y M. P. Portillo Baquedano</i>	
15. Utilización nutritiva de β -carotenos.....	199
<i>S. Navas-Carretero y J. I. Monreal Marquiegui</i>	
16. Utilización nutritiva de la vitamina C en función de las necesidades fisiológicas.....	203
<i>D. García-Díaz y J. A. Martínez Hernández</i>	
17. Estudio del efecto de la vitamina D en el recambio óseo mediante el análisis de marcadores bioquímicos: hidroxipirrolina y calcio en orina.....	207
<i>C. Bald Garmendia</i>	
18. Efectos tóxicos del alcohol: cirrosis hepática.....	213
<i>M. T. Macarulla Arenaza, C. Bald Garmendia y V. M. Rodríguez Rivera</i>	
19. Estudio del metabolismo basal en humanos.....	217
<i>B. Martínez de Morentin Aldabe, M. Hernández Ruiz de Eguilaz y J. A. Martínez Hernández</i>	
20. Determinación del grado de utilización energética de los alimentos a partir del cociente respiratorio.....	221
<i>F. I. Milagro Yoldi y D. Ansorena Artieda</i>	

Sección 2. Evaluación del estado nutricional

- 21.** Valoración del peso, la talla y concentración de creatinina en orina..... 227
I. Abete Goñi, P. López-Legarrea y R. de la Iglesia González
- 22.** Evaluación del crecimiento en la infancia y la adolescencia..... 231
I. Díez López, I. Labayen Goñi y V. M. Rodríguez Rivera
- 23.** Composición corporal..... 247
M. Hernández Ruiz de Eguílaz, B. Martínez de Morentin Aldabe, S. Pérez-Diez, J. A. Martínez Hernández
- 24.** Intolerancia a hidratos de carbono 251
M. C. Mugueta Uriaque y N. Varo Cenarruzabeitia
- 25.** Evaluación de alteraciones del metabolismo lipídico 257
A. González Hernández y E. Alegre Martínez
- 26.** Determinación de la albúmina, transtiretina, transferrina y proteína transportadora del retinol (RBP) como índices del metabolismo proteico..... 263
N. Varo Cenarruzabeitia y M. C. Mugueta Uriaque
- 27.** Biodisponibilidad de minerales..... 269
S. Navas-Carretero y M. T. Macarulla Arenaza
- 28.** Actividad glutatión reductasa eritrocitaria como indicador en estados de deficiencia en vitamina B₂..... 275
S. Lorente-Cebrián, M. Zabala Navó, M. J. Moreno-Aliaga
- 29.** Determinación de la vitamina B₆..... 281
A. Moleres Villares, T. Rendo-Urteaga, C. Galbete Ciaurriz y A. Martí del Moral
- 30.** Valoración del estado nutricional en humanos a través de biomarcadores inmunológicos..... 285
S. Gómez-Martínez, L. E. Díaz Prieto, J. Romeo Marín y A. Marcos Sánchez
- 31.** Evaluación bioquímica del estado nutritivo con métodos de diagnóstico rápido 293
M. A. Zulet Alzórriz, I. Abete Goñi y J. A. Martínez Hernández

Sección 3. Nutrición humana y dietética

- 32.** Cálculo del gasto energético total y valoración de la actividad física 301
H. H. M. Hermsdorff, I. Labayen Goñi y A. Fernández-Quintela
- 33.** Encuestas dietéticas de valoración de la ingesta individual 309
E. Sánchez Campayo e I. Zazpe García

34. Cuestionarios de evaluación rápida del estado nutricional. <i>Mini Nutritional Assessment (MNA)</i>	317
<i>M. Cuervo Zapatel y J. A. Martínez Hernández</i>	
35. Empleo de listas de intercambio para enfermos renales.....	331
<i>G. Peré Ceballos, M. Hernández Ruiz de Eguilaz</i>	
36. Adaptación y aplicación del cuestionario de conducta de alimentación infantil CEBQ	339
<i>A. González y J. L. Santos Martínez</i>	

Sección 4. Investigación en nutrición

37. Papel del sistema nervioso central y sistema gastrointestinal en la regulación del apetito.....	347
<i>A. Solomon Edwards y M. Marqués Feliù</i>	
38. Determinación de los niveles plasmáticos de leptina e insulina	351
<i>M. Fernández-Galilea, S. Lorente-Cebrián y M. J. Moreno-Aliaga</i>	
39. Valoración de las interacciones fármaco-nutriente a partir de material bibliográfico	355
<i>M. A. Zulet Alzórriz y A. Martí del Moral</i>	
40. Determinación del estado oxidativo celular y/o tisular: actividad SOD, producción del anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ e hidroperóxidos.....	359
<i>P. L. Prieto-Hontoria, P. Valdecantos Jiménez de Andrade y P. González-Muniesa</i>	
41. Cultivos celulares: análisis de la diferenciación de adipocitos 3T3-L1	363
<i>I. Churruca Ortega, J. Miranda Gómez y A. Lasa Elgezua</i>	
42. Aislamiento, manejo y estudios en mitocondrias hepáticas	371
<i>P. Valdecantos Jiménez de Andrade y P. Pérez-Matute</i>	
43. Aplicaciones de los isótopos estables en la nutrición y en el diagnóstico clínico.....	377
<i>A. Díaz-Lagares y A. B. Crujeiras Martínez</i>	
44. Proteómina: técnicas de electroforesis y Western-Blot.....	385
<i>V. M. Rodríguez Rivera y J. Miranda Gómez</i>	
45. Investigación con RNA y técnicas de PCR.....	391
<i>E. Goyenechea Soto e I. Churruca Ortega</i>	
46. Nutrigenética y epigenética: técnicas de SNP y MSP.....	397
<i>P. Cordero Sánchez, E. I. Milagro Yoldi y J. Campión Zabalza</i>	
47. Diferenciación del perfil metabólico de individuos mediante una estrategia metabólica no dirigida	403
<i>I. Bondia-Pons y J. A. Martínez Hernández</i>	

Sección 5. Elementos de aplicación en nutrición y dietética

48. Nutrición enteral	409
<i>C. Lacasa Arregui</i>	
49. Confección de dietas: ingestas dietéticas de referencia y tablas de composición de alimentos	417
<i>M. I. Zubieta Satrústegui, S. Santiago Neri y M. Cuervo Zapatel</i>	
50. Programa informático para la valoración del estado nutricional y la confección de dietas	423
<i>M. Cuervo Zapatel, L. García de Diego, J. A. Moreno Rello y J. A. Martínez Hernández</i>	
51. Preparación de una dieta de adelgazamiento en una situación de sobrepeso	431
<i>S. Navas-Carretero, G. Russolillo Femenías y J. A. Martínez Hernández</i>	
52. Estudio SUN [Seguimiento Universidad de Navarra]	445
<i>C. Sayón-Orea, A. Martí del Moral, J. A. Martínez Hernández y M. A. Martínez-González</i>	
53. Elaboración de un protocolo de ética para estudios de intervención en humanos	453
<i>M. A. Zulet Alzórriz y J. López Guzmán</i>	
54. Búsqueda bibliográfica	461
<i>J. Campión Zabalza, A. M. Gómez-Úriz y J. A. Martínez Hernández</i>	
55. Estadística	467
<i>A. Sánchez Villegas y J. A. Martínez Hernández</i>	
ÍNDICE ANALÍTICO	475

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1. Ciencias de la Alimentación
2. Composición de los alimentos
3. Utilización nutritiva de los alimentos
4. Balance energético: peso y composición corporal
5. Nutrición y recomendaciones dietéticas
6. Nutrición humana
7. Nutrición y estado nutricional
8. Interacciones entre fármacos y nutrientes
9. Investigación en nutrición: métodos para el estudio de la utilización y funciones de los nutrientes
10. Diseño y análisis estadístico en estudios de nutrición

Ciencias de la Alimentación

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

1. Definir los conceptos de alimento y nutriente.
2. Identificar los elementos básicos de las Ciencias de la Alimentación y sus ramas.
3. Reconocer la historia y la evolución de las Ciencias de la Alimentación, así como discernir los retos de este campo para el siglo XXI.

CONCEPTOS PRELIMINARES

La definición de *alimento* puede obtenerse del Código Alimentario Español –cuerpo orgánico de normas básicas y sistematizadas relativas a alimentos, condimentos, estimulantes y bebidas– según la cual, tienen la consideración de alimento todas las sustancias o productos de cualquier naturaleza, que por sus características, aplicaciones, preparación y estado de conservación son susceptibles de ser habitual o idóneamente utilizados para alguno de los fines siguientes:

- a) Para la normal nutrición humana o como fruitivos.
- b) Como productos dietéticos en casos especiales de alimentación humana.

Los componentes de los alimentos que aseguran esos objetivos y que cumplen al menos una de estas funciones, energética, estructural y/o reguladora, son denominados nutrientes, los cuales se clasifican en:

- Hidratos de carbono.
- Lípidos.
- Proteínas.
- Minerales.
- Vitaminas.
- Agua.

En este contexto, la dieta adecuada es aquella que contiene cantidades apropiadas de todos los nutrientes para cubrir las necesidades vitales y mantener la salud de una persona o colectividad.

El Consejo de la Unión Europea (UE) ha adoptado una serie de directivas sobre alimentos, que abarcan la definición y normalización de sus características y también las condiciones de etiquetado, conservación, transporte, empleo de aditivos y la elaboración de productos destinados a la alimentación. De esta labor legislativa saldrá el perfil definitivo del Derecho Comunitario de la alimentación para la protección de la salud y seguridad de los consumidores y el desarrollo del sector alimentario, en el que habrá de tener en cuenta aspectos de producción, uso de aditivos, aceptabilidad por el consumidor y calidad del producto, así como las nuevas operaciones y manipulaciones tecnológicas de los alimentos. La reglamentación también permite ofrecer garantías respecto a los mensajes y características del etiquetado de los alimentos en función de las alegaciones nutricionales y saludables, así como a las propiedades y desarrollo de nuevos alimentos funcionales.

CONCEPTOS BÁSICOS



Entre las ciencias dedicadas al estudio de los alimentos y la alimentación, cubriendo diferentes puntos de vista, se encuentran la Nutrición, la Bromatología, la Dietética, la Dietoterapia y la Tecnología de los alimentos.

- **Nutrición:** del latín *nutrire*, se interesa preferentemente por el estudio de la utilización que hace el organismo de los nutrientes para llevar a cabo las funciones de homeostasis, crecimiento y reproducción; en definitiva de los procesos de ingestión, transformación y utilización de los alimentos.
- **Bromatología:** del griego *bromos-atos*, se dedica primariamente al conocimiento de la naturaleza, composición, elaboración, fabricación, alteración y conservación de los alimentos.
- **Dietética:** etimológicamente, la palabra deriva del griego *dayta* que significa "régimen de vida". Estudia las características de las dietas destinadas a cada individuo o colectividad necesarias para su adecuado desarrollo, según el estado fisiológico y las circunstancias existentes.
- **Dietoterapia:** considera las características que ha de tener la alimentación destinada a patologías susceptibles de ser tratadas por medios dietéticos.
- **Tecnología de los alimentos:** se ocupa de los métodos, equipos y procedimientos destinados a la producción, transformación, conservación, presentación, transporte, etc. de los alimentos.

EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LAS CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

La humanidad se ha alimentado desde tiempos remotos siguiendo prácticas empíricas, de modo que los componentes de su dieta fueran seguros, nutritivos y satisfactorios para cubrir sus necesidades vitales, sin efectos dañinos.

El estudio de los alimentos y su aprovechamiento por el organismo, desde una óptica científica es un empeño reciente que se remonta a no más de doscientos años. En cada momento, se han ido incorporando nuevas informaciones y métodos analíticos en consonancia con los avances propios de la ciencia.

Ciencias de los alimentos hasta el siglo XIX

Las primeras referencias escritas sobre alimentación se encuentran en la Biblia y en las obras del historiador Herodoto (siglo VI a. C.), donde existen diversos comentarios sobre la elaboración y características del pan y otros alimentos, junto con consideraciones dietéticas relacionando la posible incidencia de los alimentos sobre la salud y la enfermedad. En esta línea, también se encuentran indicaciones en los libros de los tres grandes maestros de la medicina antigua: Hipócrates, Celsus y Galeno (entre los siglos V a. C. y II d. C.), cuyas ideas perduran en la Baja Edad Media (siglos IX-XIV) apoyados por las teorías y escritos de Rhazes, Joanitius, la Escuela de Salerno y Roger Bacon.

En el Renacimiento italiano (siglos XV y XVI), Paracelso, Leonardo da Vinci y Santorius se preocupan por el balance entre la ingesta y la eliminación de los alimentos por el organismo, mientras que en el siglo XVII Boyle trabajó en la influencia de los alimentos sobre la composición del cuerpo, de la sangre y de la orina y también sugirió una semejanza entre los procesos de respiración y combustión.

Durante el período de 1700 a 1800 se realizaron importantes avances científicos, que contribuyeron en gran medida al desarrollo directo, o indirecto, de las ciencias de los alimentos, a través de los estudios y trabajos de Cavendish, Black, Rutherford, Priestley, Scheele, Lavoisier, de Saussure, Gay-Lussac, Davy, Berzelius, Bertholet, Thomson, Beaumont, Dumas, Baussigault

y otros, sobre los componentes químicos de la materia y, por supuesto, de los alimentos.

Así, Scheele describió el ácido láctico y otros ácidos orgánicos, sugirió la conservación del vinagre por el calor (1782) y descubrió el cloro y el oxígeno. Priestley también identificó en esta época, de forma independiente, el oxígeno, mientras que entre 1757 y 1772 Black, Cavendish y Rutherford caracterizaron el anhídrido carbónico, el hidrógeno y el nitrógeno, respectivamente.

Antoine Lavoisier (1743-1794), considerado uno de los padres de la Nutrición deshechó la teoría del flogisto y desarrolló la química de la combustión con estudios sobre la respiración, el valor energético de los alimentos y el consumo de oxígeno en función del gasto energético.

En los comienzos del siglo XIX, químicos de la escuela francesa como Bertholet, Gay-Lussac, de Saussure y Thenard, entre otros, junto con el sueco Berzelius y el escocés Thomson investigan sobre el contenido en nitrógeno, carbono, hidrógeno y agua de diferentes alimentos y bebidas. También en este período, el químico inglés Davy, aísla y caracteriza el potasio, sodio, bario, estroncio, calcio y magnesio, mientras que Chevreuil enumeró los elementos existentes en los productos orgánicos y describió distintas técnicas analíticas para materiales animales y vegetales. En esta época Baussigault establece una posible relación entre el yodo y el bocio y la importancia del calcio para el crecimiento.

Junto con los notables avances en el campo de la Química, científicos como Stark estudian el efecto de la ingestión de diferentes alimentos sobre la salud o investigadores como Magendie establecen la necesidad de ingerir alimentos nitrogenados, mientras Bernard describe la influencia de la dieta sobre la homeostasis corporal y otros como Proust, Reamur y Beaumont se preocupan de los procesos digestivos, investigando sobre la naturaleza del ácido clorhídrico y la degradación de los componentes de los alimentos.

Los trabajos de Justus Von Liebig (1803-1873), que fueron en parte publicados en el que es considerado primer libro sobre Química de los Alimentos, contribuyen de forma notable a la evolución de las ciencias de los alimentos. Así, este investigador alemán estudió el proceso de fermentación del vinagre, identificó la tirosina en la leche, clasificó los alimentos en nitrogenados y no nitrogenados, a los que atribuyó funciones “plásticas” y “respiratorias”, respectivamente y, junto a Mulder, describió a las proteínas como una clase química, a la que inicialmente atribuyó sólo valor energético.

Hacia la mitad del siglo XIX, ya eran conocidos la mayoría de los componentes de los alimentos y la estación de Weende en Alemania, desarrolló un procedimiento para determinar el contenido en agua (humedad), grasa, cenizas y nitrógeno en los alimentos. Estos avances quedan reflejados



QUIÉN ES QUIÉN EN LAS CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Desde la Antigüedad hasta el Siglo XVIII

- Herodoto, Hipócrates, Celsus y Galeno (s. VI a.C. - s. II d.C.). Relación alimentación-salud. Elaboración de productos y dietas.
- Rhazes, Joanitius, la Escuela de Salerno y Roger Bacon (Baja Edad Media, s. IX-XIV). Aplicación de la alimentación para el tratamiento de la enfermedad. Relación alimentación-salud.
- Paracelso, Leonardo da Vinci y Santorius (Renacimiento italiano, s. XV-XVI). Relación del balance entre ingesta y eliminación de alimentos por el organismo.
- Boyle (s. XVII). Reconocimiento de la influencia de los alimentos sobre la composición del cuerpo y fluidos corporales. Identificación de semejanzas entre los procesos de respiración y de combustión.

Siglo XVIII

- Scheele (1782) y Priestley (1780-1790). Descripción del ácido láctico y otros ácidos orgánicos. Identificación del cloro y el oxígeno.
- Black, Cavendish y Rutherford (1757-1772). Caracterización del anhídrido carbónico, el hidrógeno y el nitrógeno.
- Lavoisier (1743-1794). Desarrollo de la química de la combustión. Estudios sobre la respiración, valor energético de los alimentos y consumo de oxígeno.

en el libro de Pavy *Treatise on food and dietetics* publicado en 1879, en el que se presentan la composición de numerosos alimentos y algunas de las funciones nutritivas de las proteínas, hidratos de carbono, lípidos y minerales, a partir de los estudios de Trube, Frankaand y otros. También en esta época se establecen escuelas agrícolas donde se imparten las primeras enseñanzas específicas sobre Nutrición y Bromatología en Europa y los Estados Unidos, mientras que en España la primera cátedra de Análisis Químico y Especial de Alimentos data de 1882.

En estos años de finales del siglo XIX, se llevan a cabo los primeros ensayos para evaluar las necesidades de los diferentes principios inmediatos en el ser humano. Así, Dumas durante el sitio de París de 1871, señala que “fórmulas” elaboradas con mezclas de hidratos de carbono, lípidos, proteínas y minerales son insuficientes para asegurar un adecuado desarrollo y crecimiento de la población infantil.

El valor energético de los diferentes nutrientes y alimentos, en términos de calorías, fueron firmemente establecidos por Carl Voit y Rubner en Alemania y por Atwater, Lusk y otros en América, confirmando la teoría de que la energía necesaria para la vida es suministrada por el “metabolismo” de los alimentos que componen la dieta, postulando así los conceptos actuales de metabolismo basal y “acción dinámico-específica” o termogénica de los alimentos.

Estos avances de los estudios y conocimientos de Nutrición y Bromatología fueron contemporáneos a la iniciación de la adulteración y falsificación de los alimentos, lo que estimuló el desarrollo de la química analítica de los alimentos. Estas prácticas fraudulentas condujeron al establecimiento de diferentes protocolos oficiales de análisis químico y microbiológico, como el “Diccionario de alteraciones y falsificaciones alimentarias” en 1885; y la elaboración de diferentes normas legales destinadas a proteger al consumidor, como la *Pure Food and Drug Act* de 1906 y la aprobación de aditivos autorizados por la Sociedad Universal de la Cruz Blanca en 1908, que en la actualidad se recogen en las normas de la FDA en los Estados Unidos, en los códigos alimentarios de diferentes países europeos y en las directivas de la Comunidad Económica Europea.

Paralelamente a los trabajos relativos al estudio de la naturaleza, caracterización y utilización de los

principios inmediatos, que tienen lugar en el siglo XIX, existe una creciente preocupación referente a la fabricación, conservación y alteraciones de los alimentos. En este contexto, los pioneros estudios de Scheele, sobre la conservación del vinagre mediante el calor, fueron confirmados por Appert mediante trabajos sobre mantenimiento de alimentos en recipientes herméticos tratados térmicamente y que más tarde fueron aclarados, de forma definitiva, por Pasteur (1822-1895) en sus clásicos ensayos sobre alteraciones de alimentos por microorganismos.

La conservación de alimentos mediante la aplicación de frío fue iniciada por Cailletet hacia 1840, mientras que las técnicas de congelación se pusieron en práctica casi un cuarto de siglo después. Por otra parte, la desecación como método de conservación de alimentos parece ser que se utilizó industrialmente, por primera vez, a partir de una patente británica de 1780, ganando gran popularidad con el paso de los años.

En cuanto a la elaboración de nuevos productos alimenticios, se desarrollan a lo largo del siglo XIX diferentes tecnologías, entre las que pueden destacarse la elaboración de margarina como sustitutiva de la mantequilla y la aparición de harinas lacteadas, leche desecada y leche condensada, cuya fabricación a gran escala fomentó el avance de la Tecnología Alimentaria. En este período también se caracterizan e identifican diferentes azúcares (glucosa, fructosa, lactosa, etc.), ácidos grasos (cítrico, málico, oxálico, etc.), proteínas (gluten, colágeno, etc.) y aminoácidos (leucina, aspártico y otros) presentes en los alimentos.

Aunque desde los trabajos de Hawes y Gilbert en 1854 se sospechaba que las proteínas podían diferir en su valor nutritivo, hasta finales de siglo no se atribuyen estas diferencias a la composición aminoacídica de estas moléculas con los trabajos de Fisher.

Ciencias de los alimentos en el siglo XX

El concepto de aminoácidos esenciales postulado inicialmente por Willcock y Hopkins en los primeros años de este siglo, se demostró por la necesidad específica del triptófano, lo que posteriormente fue corroborado por Osborne y Mendel. El “óptimo proteico” fue fijado en 36 g/día por Chittenden en el libro *Physiological Economy of Nutrition*.



QUIÉN ES QUIÉN EN LAS CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS II

Siglo XIX

- Liebig [1803-1873]. Química de los alimentos. Descripción del proceso de fermentación del vinagre, clasificación de alimentos nitrogenados. Descripción de las proteínas como una especie química.
- Pavy [1789]. Publicación del libro "Treatise on food and dietetics". Análisis Weende de los alimentos. Composición de los alimentos y funciones de algunos nutrientes.
- España [1882]. Primera cátedra de Análisis Químico y Especial de Alimentos.
- Cailletet [1840]. Conservación de alimentos a través del frío.
- Voit y Rubner (Alemania), Atwater y Lusk (América). Valor energético de alimentos y nutrientes en términos de calorías.
- Finales siglo XIX. Primeros ensayos para la evaluación de necesidades en el ser humano de cada componente de los alimentos.

Siglo XX

- Willock y Hopkins, Osborne y Mendel; Chittenden. Establecimiento del concepto de *aminoácido esencial*, necesidades específicas de triptófano y definición del "óptimo proteico" en 36 g/d.
- Hopkins [1906-1912], Lind [1716-1794] y Funk [1884-1967]. Reconocimiento de la existencia de "sustancias accesorias" en los alimentos: las VITAMINAS.
- Descubrimiento de la Vitamina A y B (McCollum); Tiamina (Williams); Vitamina D (Steenbock y Mellamby), Niacina (Golberger). A finales de los años 40 concluye identificación de vitaminas.
- Finales de la II Guerra Mundial. Creación de la FAO (Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Comienzan las primeras listas con recomendaciones de nutrientes.
- Se dispara el desarrollo de técnicas analíticas. Cromatografía de reparto [1941, Martin y Lyngel], de capa fina [1958, Stahl]...

Siglo XXI

- Retos de futuro: Producción y elaboración de alimentos para la salud y la enfermedad.
- Elaboración de alimentos nutritivos, de calidad, duraderos y seguros.
- Nutrición personalizada. Nutrigenómica, Metabólica y estudios de Sistemas.

Paralelamente, entre 1906 y 1912, Hopkins especula sobre la posible existencia de "sustancias accesorias" necesarias para la vida a partir de los primeros estudios de Lind (1716-1794), que descubrió un factor antiescorbútico en algunos vegetales, hoy conocido como vitamina C, y la etiología del beri-beri que la atribuyó a una deficiencia nutritiva. Más tarde, Funk (1884-1967) denominó "vitaminas" a estos factores.

En esta línea, McCollum descubrió en 1913 el factor liposoluble A y en 1915 el factor hidrosoluble B, mientras que en los diez años siguientes fueron descubiertas la tiamina, por Williams; la vitamina D, por Steenbock y Mellamby; y la niacina, por Golberger, concluyéndose este proceso hacia los años cuarenta cuando ya se identificaron el resto de las vitaminas conocidas hasta hoy. En la actualidad se reconocen, al menos,

cuarenta constituyentes de los alimentos esenciales para la vida.

Además de las investigaciones destinadas al descubrimiento de nuevos elementos nutritivos, adquieren gran auge los estudios relacionados con la cuantificación de los procesos de síntesis y degradación de macromoléculas en el organismo, basados en los hallazgos preliminares de Schoenheimer; y de la bioenergética del crecimiento, promovidos por Brody.

Al final de la II Guerra Mundial se constituye la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) bajo la dirección de Lord Boyd Orr, quien impulsó notablemente los estudios sobre necesidades mínimas nutritivas y la producción de alimentos en el mundo, lo que le valió el premio Nobel de la Paz. En esta época, aparecen las primeras listas de reco-

mendaciones nutritivas, que sirven de referencia de las necesidades de nutrientes para distintos segmentos de la población.

Las técnicas analíticas de separación, basadas en los trabajos iniciales de Tweed (1906), introducen continuos adelantos, como la cromatografía de reparto por Martin y Lyngé (1941), la de capa fina optimizada por Stahl (1958), de intercambio iónico que les supuso a Moore y Stein en 1948 el Premio Nobel, de gases y de líquidos de alta presión (HPLC). Los métodos de electroforesis iniciados por Tiselius (1937) y de filtración en gel, por Gelody y Parath, permiten la caracterización e identificación de nuevos compuestos y el estudio del metabolismo de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, minerales, vitaminas, etc. por el organismo.

También destacan entre los métodos de valoración cuantitativa en Nutrición y Bromatología el empleo de isótopos radiactivos, las técnicas de radioinmunoensayo (RIA) descritas por Yallow, laureada con el Premio Nobel (1977), los métodos de enzimoimmunoensayo (ELISA), las técnicas de espectrofotometría de masas, etc. Gracias al desarrollo de estas técnicas se han podido valorar diversos constituyentes de los alimentos que se encuentran en concentraciones biocatalíticas o aditivos, que son responsables del color, aroma y olor, así como también la dinámica y regulación del metabolismo de los nutrientes o la intervención de mediadores en la respuesta nutritiva.

En 1934, se introdujo en España con carácter voluntario la asignatura de Bromatología y Microbiología en la Facultad de Farmacia, que se hizo obligatoria en 1936 y posteriormente pasó a denominarse en el año 1943, Análisis Químico Aplicado y Bromatología. La asignatura de Nutrición y Dietética figura como asignatura optativa en la Licenciatura de Farmacia desde finales de los años setenta en algunas Facultades, apareciendo como materia troncal en los nuevos planes de estudios de Farmacia, y como optativa, en los de Medicina. La diplomatura de Nutrición Humana y Dietética se implanta en España hacia 1990 y es reconocido como grado en 2009.

En los años cincuenta y bajo los auspicios de la Unión Internacional de Química Analítica Aplicada aparecen las primeras listas "positivas" de aditivos, acogidas al criterio de prohibir aquellos que no se encuentren recogidos en ellas. En esta línea, la Comisión mixta de la FAO/OMS del

Codex Alimentarius recopila las normas internacionales para proteger la salud del consumidor y asegurar la corrección de las prácticas comerciales con los productos alimenticios.

En este sentido, el Código Alimentario Español aparece en 1967. La directiva 881/82/CEE establece el perfil del futuro Derecho Comunitario de la Alimentación, según el cual todas las disposiciones en el ámbito alimentario deben garantizar adecuadamente la protección de la salud de los consumidores y de sus intereses económicos así como la buena fe de las transacciones comerciales.

Las primeras recomendaciones dietéticas (RDA), elaboradas por el *National Research Council* (USA), aparecen en el año 1943 y pretenden servir de referencia de las necesidades de nutrientes para distintos segmentos de la población, habiendo alcanzado ya la 12.^a edición (2003). De forma paralela, se promueve el concepto de nutrición clínica basada en principios científicamente comprobados. La última edición de ingestas de referencia en España ha sido elaborada por la Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD) y publicada en 2010.

Ciencias de los alimentos en el siglo XXI

En el momento actual, los alimentos que llegan al consumidor procedentes de las actividades agrícolas, pesqueras y ganaderas deben ser sometidos generalmente a una serie de operaciones y manipulaciones tecnológicas destinadas a una adecuada conservación, almacenamiento, presentación, transporte, etc., e incluso deben ser considerados los aspectos ecológicos de la producción (desechos nitrogenados, pesticidas, etc.). Además, los alimentos actuales, que en gran parte provienen de la transformación más o menos profunda de las materias primas, implican la implantación de nuevos métodos de producción (empleo de promotores, fertilizantes, etc.), la autorización del empleo de diferentes aditivos (conservantes, colorantes, estabilizantes, etc.) en beneficio de la aceptabilidad y calidad. La aparición de nuevos alimentos y procesos tecnológicos (concentrados de proteínas, extractos vegetales, levaduras, etc.) y nuevas técnicas de almacenamiento, conserva-

ción, presentación, etc. ha planteado la necesidad de ampliar las técnicas analíticas y el establecimiento de nuevos sistemas de control.

Las tendencias actuales se dirigen a la nutrición personalizada, basada en criterios genéticos, a través de la nutrigenómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica y los estudios de sistemas. La definición de las ingestas de referencia para diferentes grupos de población es otro de los retos de la nutrición del siglo XXI, junto con la caracterización de nuevos ingredientes funcionales a través de estudios de intervención nutricional.

En este contexto, los trabajos en Ciencias de los Alimentos consideran los siguientes aspectos:

- Aspectos analíticos.
- Aspectos higiénico-sanitarios.
- Aspectos metabólicos, dietéticos y clínicos.
- Aspectos tecnológicos.
- Aspectos sociales, educativos y de consumo.
- Aspectos legislativos.
- Aspectos de investigación.

Siendo sus objetivos los siguientes:

- Producción y elaboración de alimentos para una alimentación de la población en la salud y en la enfermedad.

- Elaboración de alimentos nutritivos, de calidad, duraderos, seguros y satisfactorios.

Los avances en Nutrición, Bromatología, Dietética y Tecnología de los Alimentos se recogen en diferentes publicaciones de la especialidad. La fundación y creación de una serie de sociedades de ámbito nacional e internacional aseguran el progreso, la educación y el intercambio de conocimientos en el campo de las Ciencias de los Alimentos.

Las investigaciones sobre alimentos funcionales y sus posibles beneficios son notables en los últimos años, lo cual ha quedado plasmado en diversas reglamentaciones de la FDA y la Unión Europea, donde se distinguen las alegaciones nutricionales y saludables (Reglamento CE 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, Directiva 2008/100/CE de la Comisión Europea y Reglamento CE 116/2010 del Parlamento Europeo y del Consejo). En España, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y la FESNAD son elementos de referencia en relación a temas de nutrición, alimentación y dietética, así como sobre seguridad alimentaria.

Composición de los alimentos

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

1. Reconocer los componentes de los alimentos y sus funciones.
2. Aproximarse al análisis de alimentos e identificar las distintas fracciones que componen el alimento.
3. Definir los grupos básicos de alimentos y conocer el valor nutritivo de los mismos.

Los alimentos son sustancias de naturaleza compleja que contienen los elementos necesarios para el mantenimiento de las funciones vitales por el organismo. En la actualidad, se reconocen en los alimentos más de cuarenta constituyentes esenciales, entre los que se encuentran los hidratos de carbono, los lípidos, las proteínas, los minerales, las vitaminas y el agua.

ANÁLISIS DE LOS ALIMENTOS

El análisis proximal de alimentos (esquema de Weende), consiste en una secuencia de procesos fisicoquímicos (Fig. 2-1), que constituye la base para la descripción, cualitativa y cuantitativa, de la composición de los alimentos a través de las determinaciones de humedad (agua), nitrógeno total (proteína), fibra bruta (material no digestible), cenizas (sales) y extractos etéreos (componentes liposolubles).

El primer paso consiste en desecar la muestra de alimento en estufa hasta alcanzar un peso constante, donde la pérdida de peso corresponde al contenido acuoso del producto inicial. A continuación, a partir de una porción alícuota desecada se procede a la extracción con éter de los componentes liposolubles por medio de un equipo Soxhlet, obteniéndose también en este caso el extracto etéreo (grasa) del alimento por gravimetría diferencial, mientras que el residuo de la extracción, cuando se incinera permite calcular el contenido en cenizas (sales).

Una segunda porción del material desecado se utiliza para valorar la cantidad de proteína bruta del alimento, por el método Kjeldahl de medida de

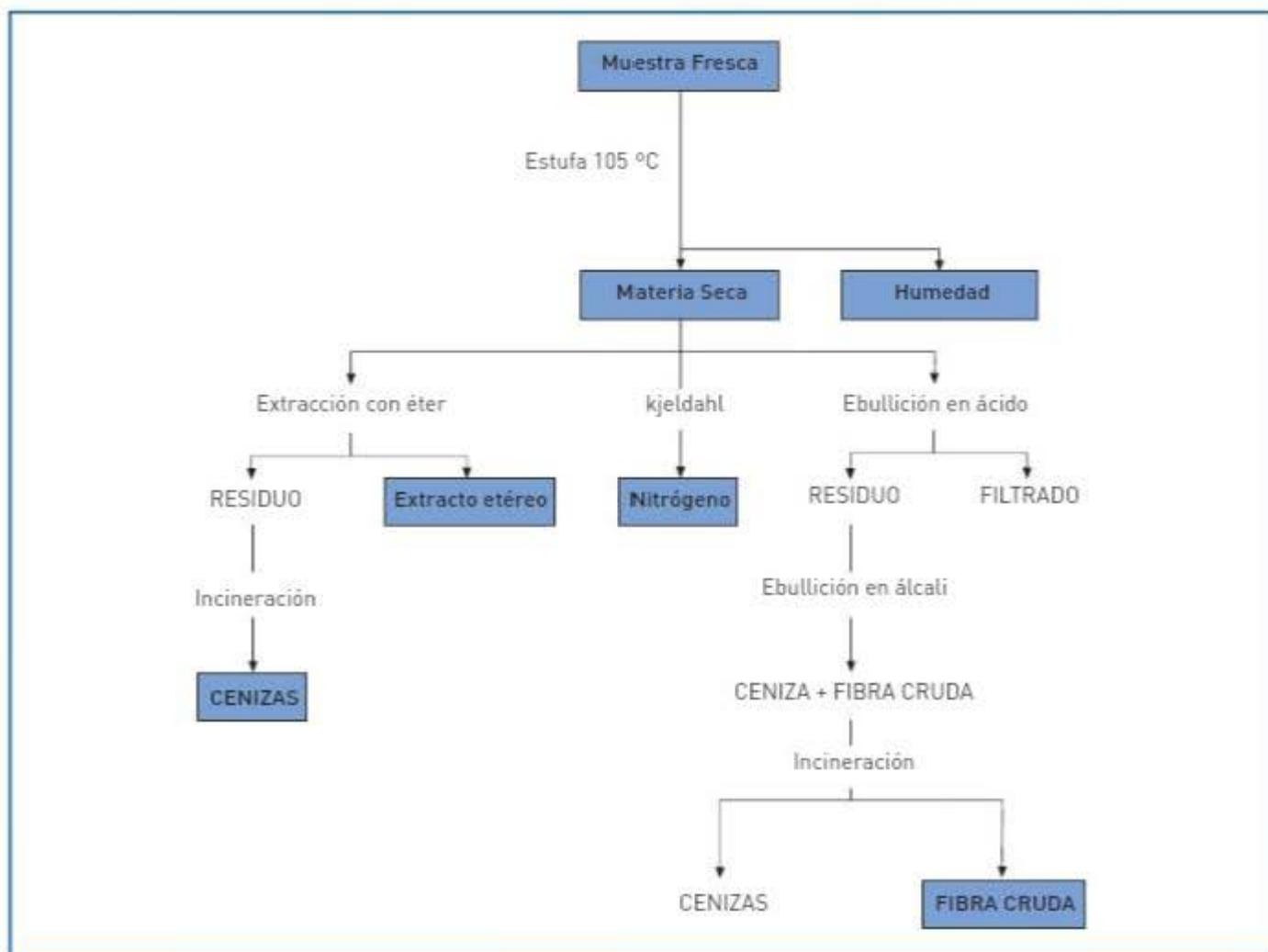


Figura 2-1. Aproximación Weende para el análisis de alimentos.

nitrógeno y multiplicando por 6,25 este valor, asumiendo que las proteínas tienen en promedio un 16% de nitrógeno.

Una tercera fracción alícuota se digiere sucesivamente con ácido sulfúrico y con hidróxido sódico durante 30 minutos, donde el material insoluble representa la fibra bruta más las cenizas.

El cálculo de los hidratos de carbono puede hacerse por diferencia respecto al total de componentes del alimento considerado, denominándose, tradicional pero imprecisamente, a esta fracción extracto libre de nitrógeno (fundamentalmente constituida por azúcares), en la que también se encuentran incluidas las vitaminas hidrosolubles.

Esta marcha analítica no permite determinar todos los nutrientes individualmente, aunque sirve de punto de partida para la identificación y

cuantificación de la mayoría de los nutrientes presentes en los alimentos.

El análisis específico de los nutrientes conocidos puede llevarse a cabo mediante diversas técnicas basadas en propiedades físico-químicas de éstos, en cuyo caso los resultados se presentan en unidades de peso (g, mg, µg,...). Alternativamente, se han empleado pruebas biológicas de utilización nutritiva, de un determinado componente de la dieta, con ayuda de animales de experimentación, y donde los valores aparecen como porcentajes respecto a un control (utilización proteica, coeficiente de digestibilidad, valor biológico, etc.); o también ensayos microbiológicos, que se fundamentan en la medida del crecimiento de cultivos de microorganismos en función de ciertos niveles del nutriente en el medio, expresándose en este caso los datos como unidades internacionales (UI).

Las determinaciones del contenido en nutrientes de los alimentos aparecen recopiladas en diferentes tablas de composición de los alimentos, que han sido recogidas por diferentes organismos internacionales (FAO, INCAP,...), instituciones nacionales (USDA, CSIC,...) o laboratorios de investigación, algunas de las cuales contienen más de 1.500 alimentos con hasta 50 componentes. En España, de acuerdo con las directrices del Ministerio de Sanidad y Consumo, el número mínimo de alimentos que deben contener las tablas de composición de alimentos que se utilicen para estudios epidemiológicos ha de ser como mínimo de 300, estimándose como deseable 500.

FRACCIONES DE LOS ALIMENTOS



Fracción componentes nitrogenados:

- Proteínas: aminoácidos esenciales y no esenciales
- No proteínas: ácidos nucleicos, aminas...

Extracto etéreo:

- Lípidos simples: triglicéridos
- Lípidos compuestos: glucolípidos, fosfolípidos...
- Lípidos derivados: colesterol, vitaminas liposolubles...

Extracto libre de nitrógeno:

- Monosacáridos: glucosa, fructosa...
- Disacáridos y oligosacáridos: sacarosa, maltosa...
- Polisacáridos digeribles: almidón y glucógeno
- Vitaminas hidrosolubles: vitaminas B y C

Fibra bruta

- Polisacáridos no digeribles: celulosa, gomas...

Cenizas

- Macrominerales: Ca, P, Mg
- Microminerales: Fe, Zn, F, I

Los valores de estas tablas son estimaciones aproximadas y representativas del contenido en nutrientes de los distintos alimentos; aunque la composición final depende de las variaciones individuales y específicas propias de los productos de origen animal o vegetal, y también de factores genéticos, edafológicos y climáticos. Los tratamientos industriales y domésticos implicados en la manipulación alimentaria, como procesado, almacenamiento, cocinado, etc., también pueden

afectar al valor nutritivo final de los alimentos ingeridos. El empleo de estas tablas está, en ocasiones, condicionado por la falta de datos de algunos alimentos o nutrientes y por la ausencia de consideraciones sobre la biodisponibilidad o de posibles interacciones entre nutrientes. Es importante que las tablas de composición de alimentos vayan incorporando alimentos precocinados y elaborados, ya que empiezan a tener una presencia significativa en la dieta de los españoles.

Las tablas de composición de alimentos pueden utilizarse para comparar el contenido en nutrientes de diferentes alimentos, para elaborar dietas equilibradas, para el establecimiento del estado nutricional, para seleccionar alimentos ricos en determinados nutrientes o para facilitar el intercambio o sustitución de alimentos con valores nutritivos semejantes, para el establecimiento de políticas nutricionales, para la educación nutricional, para la investigación y para el diseño de nuevos productos alimenticios.

VALOR NUTRITIVO DE LOS ALIMENTOS

El valor nutritivo de los alimentos depende de la cantidad y calidad de sus componentes, así como de la presencia o ausencia de sustancias que afecten a su utilización nutritiva (digestibilidad, absorción o metabolismo) o con efectos tóxicos. En este contexto, los alimentos se han clasificado de acuerdo a su valor nutritivo en los siguientes cuatro grupos básicos: grupo de la leche y derivados, grupo de la carne, grupo de las frutas y verduras y grupo del pan y los cereales.

El grupo de la **leche** incluye no sólo leche de diferente origen sometida a diferentes tratamientos, sino también sus derivados como los quesos, yogures, etc. Estos alimentos tienen una alta digestibilidad, que oscila entre el 95-100%, y su valor nutritivo se fundamenta en la presencia de proteínas de alta calidad, así como en niveles notables de algunos minerales (calcio, fósforo,...), de vitaminas del complejo B y de vitamina A. Ocasionalmente, algunos productos lácteos están fortificados con vitamina D o hierro y son, por tanto, buenas fuentes de esta vitamina o mineral, respectivamente.

El grupo de la **carne** está formado por alimentos heterogéneos, pero con valores nutritivos equivalentes, entre los que se encuentran las carnes y pescados de diferente procedencia y natura-

leza (ovino, vacuno, caprino, porcino, volatería, productos marinos,...), los huevos, las legumbres y los frutos secos, cuya digestibilidad varía entre el 70 y el 100%. Los alimentos de este grupo aportan fundamentalmente proteínas, que pueden ser de elevado valor biológico (carne, pescado, huevo) o medio (legumbres) y lípidos con diferente grado de saturación (grasas animales y vegetales, pescados azules,...). También estos alimentos son ricos en ciertos minerales como hierro, fósforo, magnesio, zinc,... y vitaminas del complejo B. Las vísceras son excelentes fuentes de vitaminas liposolubles y los pescados de yodo y flúor.

Las **frutas y verduras** constituyen otro grupo de alimentos cuyo valor nutritivo se atribuye fundamentalmente al aporte de vitaminas hidrosolubles (B y C), carotenoides precursores de vitamina A y minerales (hierro, calcio, magnesio,...), aunque éstos dependen de los niveles en el suelo. La digestibilidad de los alimentos de este grupo oscila entre el 50 y el 100% debido a la presencia de fibra dietética (material no digerible), como pectinas, celulosa, hemicelulosa etc., en distinta proporción en sus integrantes.

El grupo del **pan y cereales** contiene abundantes hidratos de carbono, de tal forma que estos alimentos son utilizados en el suministro de calorías para la dieta, además de aportar proteínas de valor biológico medio. El valor nutritivo del grupo se completa con niveles representativos de algunos minerales (hierro, zinc, calcio, magnesio,...) y vitaminas del complejo B. La digestibilidad de los componentes de este grupo es variable, en función del contenido en material no degradable. Algunos cereales y sus derivados también se emplean como proveedores de fibra (harinas integrales).

El azúcar (sacarosa) y los aceites (triglicéridos) también pueden ser importantes en el suministro de calorías de la dieta.

El valor energético de un alimento o bebida depende de su contenido en hidratos de carbono, lípidos y proteínas y es muy variable (Tabla 2-1). El agua de un alimento tiene una gran importancia, ya que no aporta caloría alguna y puede representar una fracción representativa y modificable del alimento. Las bebidas alcohólicas aportan las denominadas calorías "vacías", así definidas, como consecuencia de que no proporcionan energía a partir de otros nutrientes energéticos, diferentes al alcohol.

Tabla 2-1. GRUPOS BÁSICOS DE ALIMENTOS

Grupo	Alimento	Composición	Digestibilidad	Valor nutritivo del grupo
Lácteos	Leche	87% agua 3-4 proteínas [caseína] 3-4% grasa 5% H de C (lactosa)	100%	Proteínas Ca y P Riboflavina Vitaminas complejo B Vitamina D y A
	Queso	15-40% proteínas 5-35% grasa 2% lactosa	95-100%	
	Yogur	5% proteínas 1% grasa 14% H. de C.	100%	
Carnes, pescados y derivados	Vacuno	15-20% proteínas	85-100%	Proteína Vitaminas complejo B P, Mg, Fe, Zn
	Ovino	8-30% grasa		
	Porcino	60-65% agua	80-100%	
	Aves	20-25% proteínas 3-8% grasa 60-70% agua		

Tabla 2-1. GRUPOS BÁSICOS DE ALIMENTOS (cont.)

Grupo	Alimento	Composición	Digestibilidad	Valor nutritivo del grupo
	Pescado Mariscos	15-23% proteínas 1-15% grasa 0-2% H. de C. 60-70% agua	70-100%	Además, I y F
	Huevos	12-13% proteínas 8-12% grasa 65% agua	90-100%	[+] Colesterol
Legumbres	Legumbres	19-24% proteínas 1-5% grasa 50-60% H. de C. 10-20% agua	90-100%	Proteína calidad media Almidón Fibra
Frutas y verduras	Verduras	1-5% proteínas 1-2% grasa 2-5% H. de C. 70-90% agua	50-100%	Vitamina C Vitamina A (carotenos) Vitamina Bs Fe, Mg, Ca, K Fibra
	Frutas	1-3% proteínas 0-1% grasa 5-20% H. de C.	70-100%	
	Frutos secos	15-25% proteínas 45-70% grasa 10-20% H. de C. 2-5% agua	85-90%	Ácidos grasos
Pan y cereales	Pan Harina	8-10% proteínas 1-3% grasa 50-80% H. de C. 10% agua	90-100%	Fibra Vitamina B ₆ Calorías Fe, Ca, Mg
	Cereales Arroz	6-7% proteínas 1-2% grasa 85% H. de C.		
Azúcares	Azúcar	(variable)	95-100%	Calorías
Grasas	Grasas			Vitaminas liposolubles

Utilización nutritiva de los alimentos

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

1. Identificar y clasificar los distintos nutrientes presentes en los alimentos.
2. Definir los conceptos de metabolismo y utilización metabólica.
3. Comprender las fases del proceso metabólico.
4. Discernir las rutas metabólicas específicas para cada nutriente.
5. Caracterizar los factores que influyen en el metabolismo de los nutrientes.
6. Establecer la clasificación y funciones de los diferentes nutrientes, así como sus fuentes alimentarias.

NUTRIENTES

Los nutrientes son aquellos componentes de los alimentos que pueden ser utilizados como material energético, estructural o como agentes de control de reacciones propias del organismo y que se encuentran en los alimentos.

Los nutrientes se clasifican en:

- **Hidratos de carbono o glúcidos**, cuya función primordial consiste en contribuir al aporte energético (4 kcal/g).
- **Grasas o lípidos**, con funciones energéticas (9 kcal/g), reguladoras y de sostén como constituyentes del tejido adiposo y membranas celulares.
- **Proteínas**, con valor fundamentalmente estructural y funcional, aunque también presentan un valor energético (4 kcal/g).
- **Minerales y vitaminas**, que son sustancias moduladoras de las reacciones orgánicas y actúan como reguladores y catalíticos en diferentes procesos. Algunos minerales pueden tener funciones estructurales.
- **Agua**, con funciones reguladoras y estructurales en el organismo.

CONCEPTO DE METABOLISMO

Las células del organismo obtienen la energía y los componentes estructurales a partir de los alimentos, mediante un conjunto altamente integrado de procesos fisicoquímicos, que recibe el nombre de metabolismo. Los términos anabolismo y catabolismo hacen referencia a las reacciones de síntesis y degradación de macromoléculas propias en el organismo, respectivamente. Este conjunto de reacciones metabólicas están estrechamente relacionadas. Todas ellas se dan de forma integrada, en tiempo y espacio, lo que implica que se encuentran en una situación de equilibrio dinámico, es decir, permitiendo una constancia en los componentes celulares. Además, facilitan el recambio de los componentes del organismo.

El metabolismo requiere una regulación precisa de las diferentes etapas del mismo, lo que se consigue fundamentalmente a través de la existencia de enzimas, la compartimentación celular, la carga energética y la diferenciación entre vías de síntesis y degradación. Otros factores que intervienen en la regulación son las vitaminas, los minerales, los neurotransmisores y las hormonas.

Reacciones destinadas a la obtención de energía

Los procesos de obtención y almacenamiento de energía ocurren por la oxidación (combustión)

de los nutrientes contenidos en los alimentos, gracias a una serie de reacciones de carácter degradativo de las proteínas (lipólisis, [Fig. 3-1](#)), los glúcidos (glucólisis, [Fig. 3-2](#)), lípidos (lipólisis, [Fig. 3-3](#)) y que concluyen con producción de anhídrido carbónico, agua y calorías, a través del ciclo del ácido cítrico, y en los que también participan ciertos minerales y vitaminas.

Las reacciones que presentan un balance de energía libre negativo ($AG < 0$) se producen de forma espontánea; es decir, son aquellas cuya realización implica la producción de energía. Existen transformaciones químicas que son termodinámicamente desfavorables, pero asociadas a otras reacciones pueden tener lugar de forma global.

La energía obtenida a partir de los alimentos se destina al mantenimiento de las funciones fisiológicas, tales como el mantenimiento del tono muscular, el transporte activo, la ampliación y transmisión de señales, la biosíntesis de macromoléculas y la conservación de la temperatura corporal (metabolismo basal), a la acción termogénica de los alimentos (energía necesaria para la utilización de los nutrientes) y a la actividad física que cada individuo desarrolla (sedentaria, moderada o activa). El consumo de energía depende del peso, la talla, la edad y el sexo.

Intercambio o transformación de materia

En el organismo, además de las reacciones destinadas a la obtención de energía, existen procesos

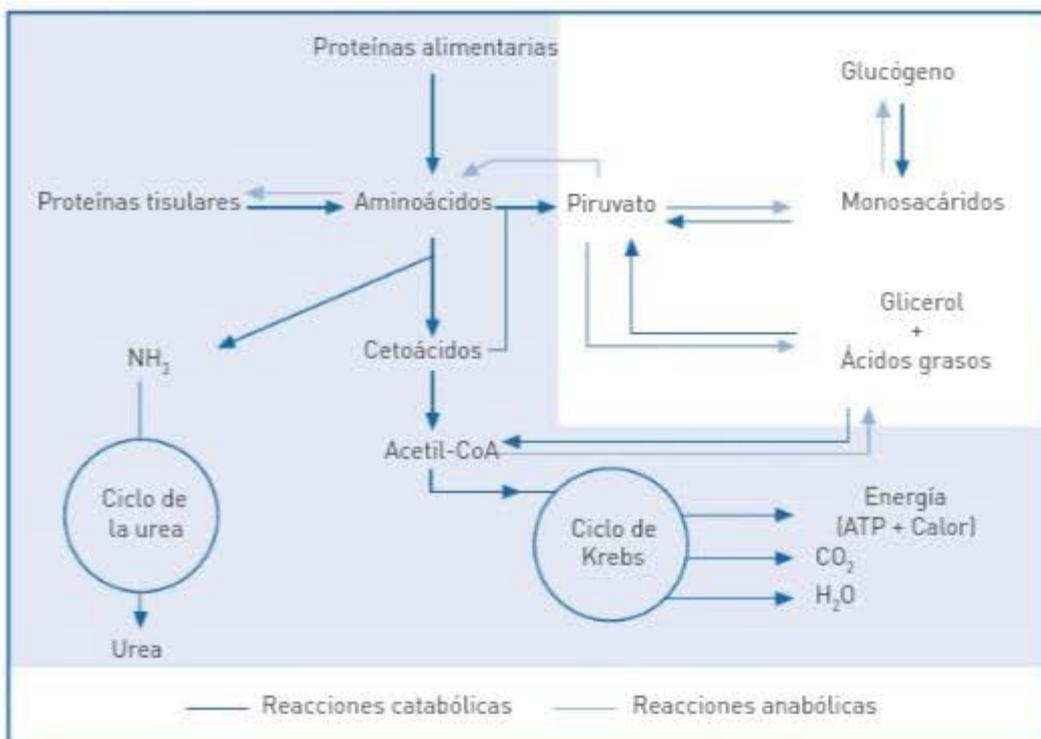


Figura 3-1. Rutas metabólicas de las proteínas.

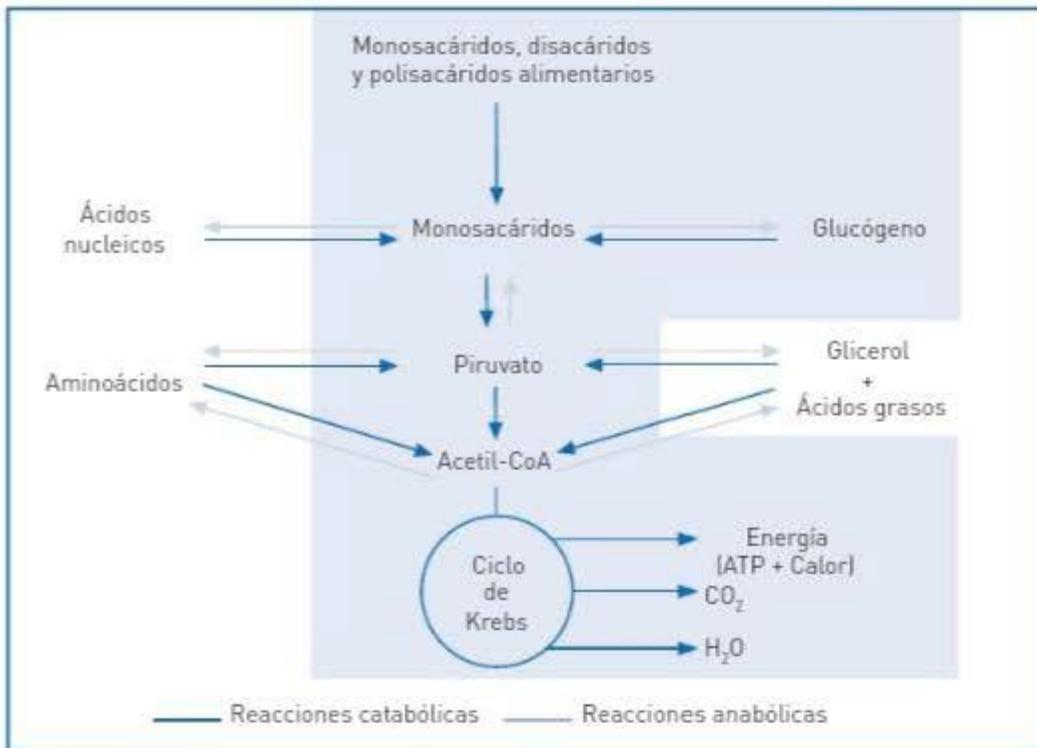


Figura 3-2. Rutas metabólicas de hidratos de carbono.

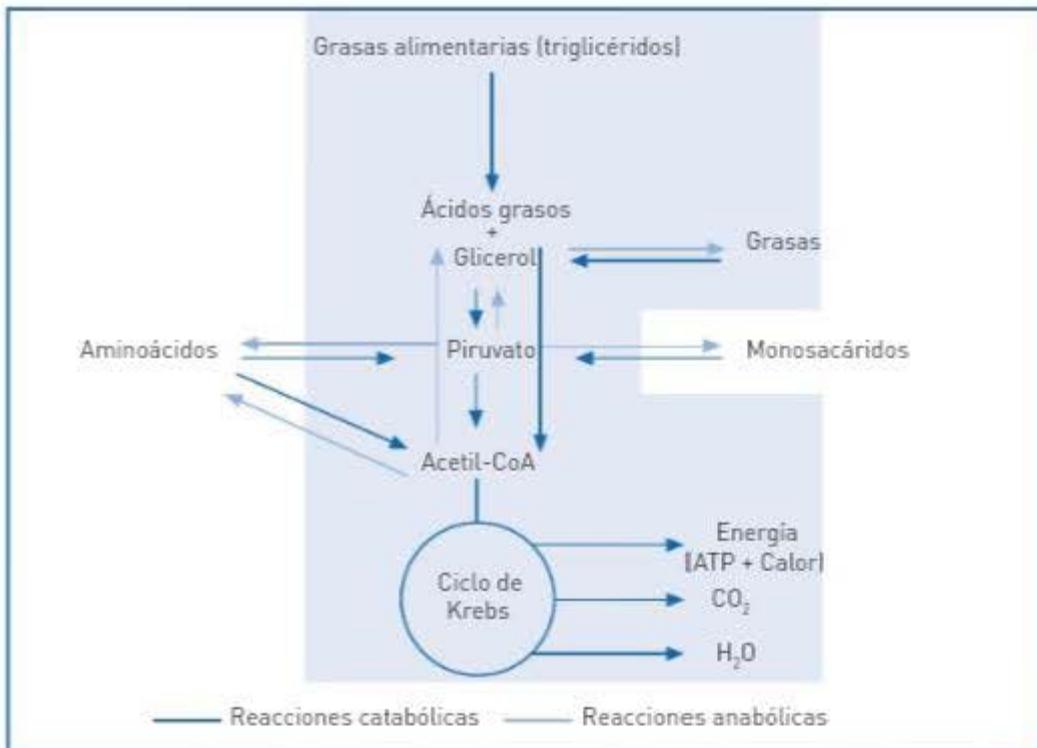


Figura 3-3. Rutas metabólicas de las grasas.

de síntesis y degradación de macromoléculas. Los procesos de síntesis o reacciones anabólicas consisten en la formación de moléculas complejas por unión y polimerización de unidades más elementales. Así, estos procesos participan en la formación de glucógeno a partir de glucosa, de triglicéridos desde ácidos grasos y glicerol, de proteínas a partir de aminoácidos y finalmente, ácidos nucleicos desde azúcares y moléculas nitrogenadas.

En las células, también coexisten reacciones catabólicas, que permiten obtener cierta cantidad de energía y la formación de moléculas centrales del metabolismo (agua, acetil-CoA, ácido pirúvico) o productos finales para su eliminación (NH_3 , urea, CO_2).

Por otra parte, los procesos de síntesis y degradación de las distintas macromoléculas, en particular de las proteínas, intervienen en una

mejor adaptación al crecimiento y a las condiciones cambiantes del medio.

Transmisión genética

Algunas de las reacciones que ocurren en el organismo pueden jugar un papel importante en el mantenimiento, la elaboración y la transmisión de material genético (DNA y RNA), participando en los procesos de regeneración, adaptación y reproducción.

METABOLISMO DE NUTRIENTES

Utilización nutritiva de los hidratos de carbono

Los hidratos de carbono, glúcidos o azúcares, son químicamente aldehídos o cetonas polihidroxilados o productos derivados de ellos (Tabla 3-1). Los hidratos de carbono con importancia nutritiva incluyen los monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa,...), disacáridos (sacarosa, lactosa,...) y polisacáridos (glucógeno, almidón,...), y desempeñan un papel fundamentalmente energético, aunque también intervienen en la síntesis de nuevas sustancias (heparina, ribosa). La fibra dietética está constituida por material de naturaleza hidrocarbonada, que no puede ser digerido, pero que juega un papel muy importante en la regulación de la fisiología intestinal.

La utilización metabólica de los glúcidos requiere (Figs. 3-4 y 3-5): a) procesos digestivos de transformación de azúcares complejos (almidones) en disacáridos y monosacáridos en la boca por medio de una amilasa salival (ptialina), b) diferentes amilasas intestinales y pancreáticas y c) su paso a la sangre por absorción a través de las células mucosales del intestino por transporte activo y difusión pasiva. Posteriormente, en los tejidos tienen lugar diferentes reacciones oxidativas para obtener energía por medio del ciclo de Krebs o de interconversión en otros nutrientes. El control del metabolismo de los glúcidos se realiza fundamentalmente por medio de la insulina, aunque otras hormonas como los glucocorticoides, la tiroxina, el glucagón, las catecolaminas y la somatotropina, también participan en su regulación, a través de cambios en los procesos de glucólisis, glucogénesis y gluconeogénesis.



FACTORES Y SITUACIONES

Hiperglucemiantes

- Alimentación
- Diabetes
- Sedentarismo
- Glucocorticoides
- Hormona de crecimiento
- Adrenalina
- Glucagón
- Fármacos

Hipoglucemiantes

- Ayuno
- Insulina
- Actividad física
- Deficiencias hormonales
- Antidiabéticos orales

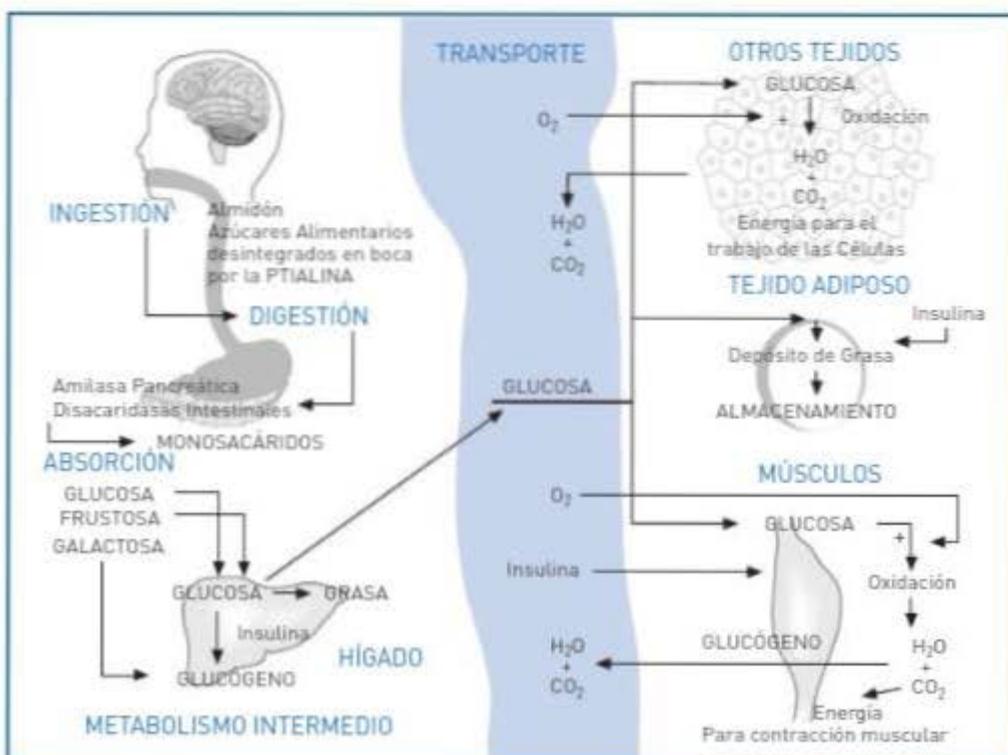


Figura 3-4. Metabolismo de los hidratos de carbono en situaciones posabsortivas.

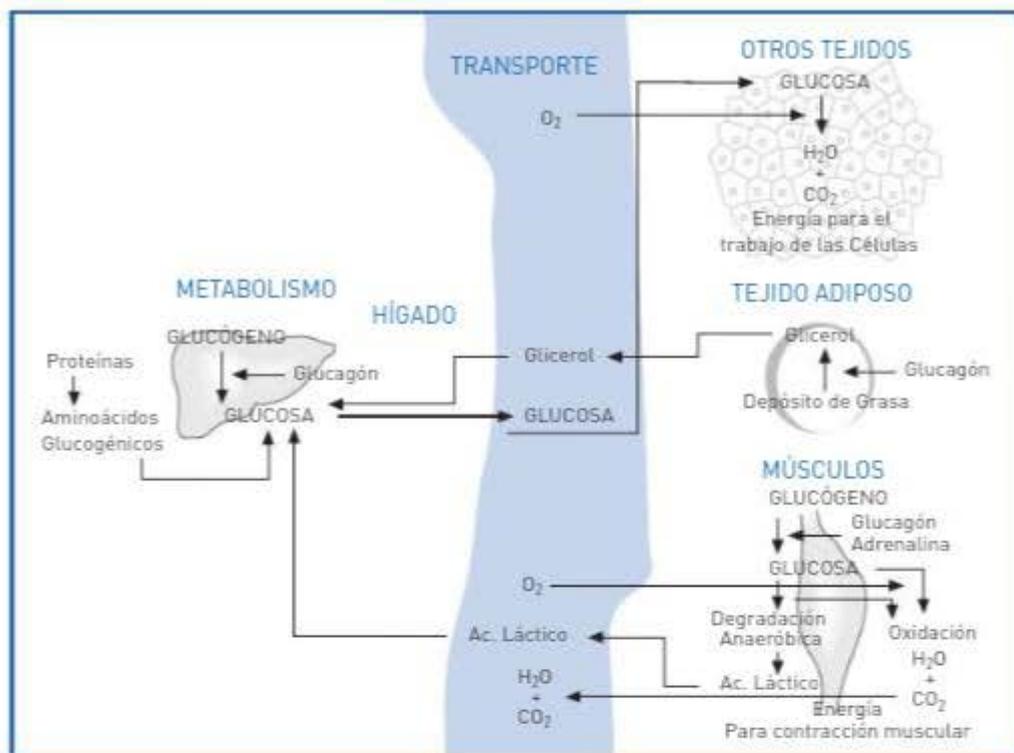


Figura 3-5. Metabolismo de los hidratos de carbono en situaciones de ayuno.

Tabla 3-1. CLASIFICACIÓN, FUNCIONES, REQUERIMIENTOS Y FUENTES DE HIDRATOS DE CARBONO

Definición: Son compuestos químicos que contienen C, H y O en la proporción CH_2O .

Clasificación

Monosacáridos ($C_6H_{12}O_6$)

- Glucosa
- Fructosa
- Galactosa

Disacáridos ($C_{12}H_{22}O_{11}$)

- Sacarosa [glucosa + fructosa]
- Lactosa [glucosa + galactosa]
- Maltosa [glucosa + glucosa]

Polisacáridos $C_n(H_2O)_{n-1}$

- Almidón
- Glucógeno
- Celulosa

Funciones

- Fuente de energía (4 kcal/g)
- Función moduladora de grasas (ahorro)
- Estructural
- Función moduladora de proteína (ahorro)
- Síntesis de nuevos compuestos (heparina, RNA, DNA, etc.)
- Regulación función digestiva (fibra)

Fuentes

- Cereales
- Legumbres
- Leche (lactosa)
- Frutas y verduras
- Dulces

Requerimientos

- No se han establecido límites mínimos de ingesta
- Son función del metabolismo basal + actividad física
- Existen variaciones de edad, sexo, situación fisiopatológica
- Recomendaciones:
 - al menos 100-125 g/día
 - 50-60% ingesta calórica deben ser H. de C.
 - Preferiblemente 40-50% polisacáridos y 10 % azúcares refinados

Enfermedades relacionadas

- Caries
- Diabetes
- Obesidad

Utilización nutritiva de los lípidos

Las grasas o lípidos constituyen un grupo estructuralmente heterogéneo de moléculas, pero con características comunes en cuanto a solubilidad, ya que son prácticamente inmisci-

bles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos (Tabla 3-2). Los triglicéridos, ésteres de un polialcohol (glicerol) con tres ácidos grasos, son los más abundantes en la dieta, perteneciendo también a este grupo los fosfolípidos, las lipoproteínas, el colesterol, etc.

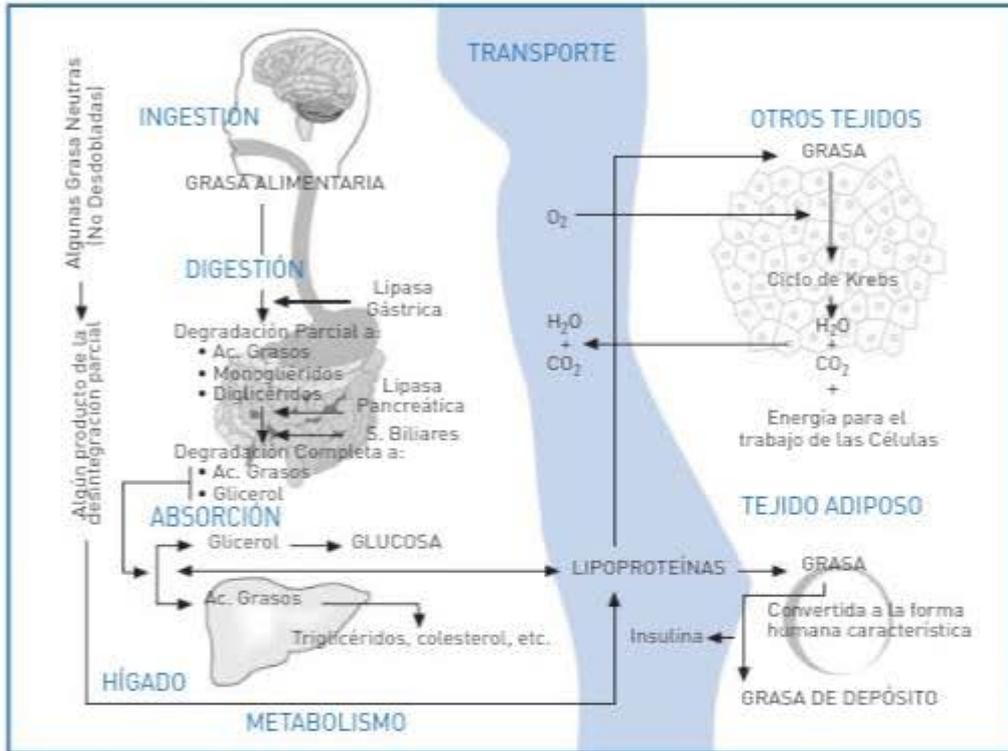


Figura 3-6. Metabolismo de los lípidos en situaciones posabsortivas.

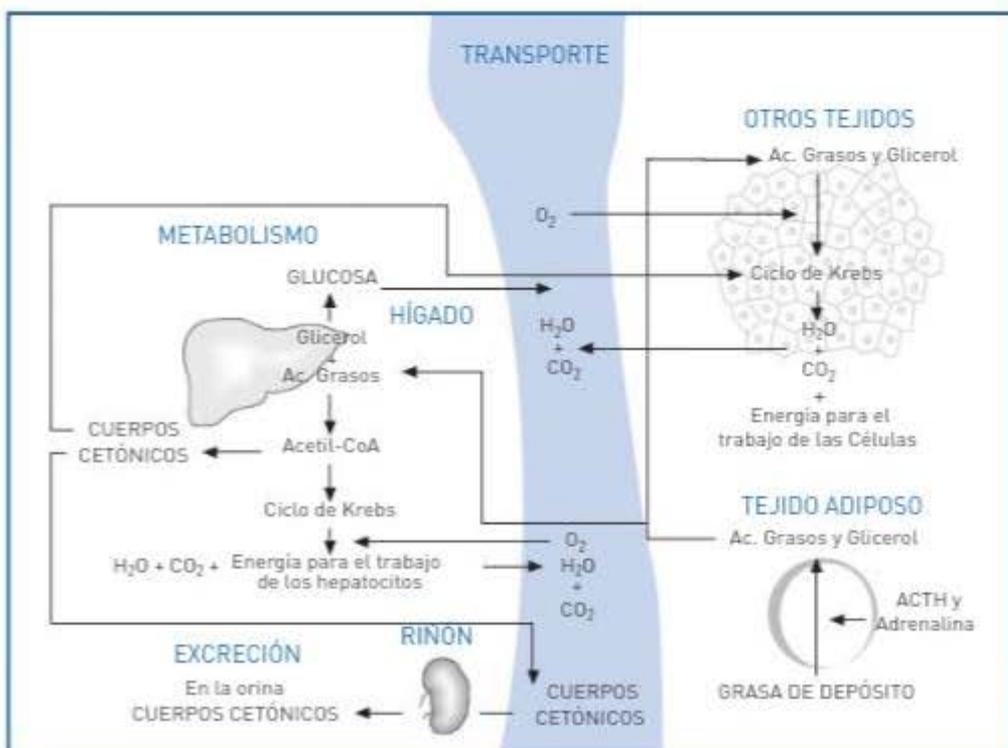


Figura 3-7. Metabolismo de los lípidos en situaciones de ayuno.

En su mayor parte, estas sustancias constituyen elementos de reserva energética y protección en el ser vivo, aunque también algunos lípidos complejos forman parte estructural de las membranas biológicas, participando activamente en diversos aspectos de la fisiología celular como la síntesis de nuevas moléculas (hormonas esteroideas y sales biliares) y en el transporte y absorción de ciertas vitaminas. La utilización digestiva de estos nutrientes comienza por la acción de enzimas pancreáticos (lipasas), mientras que las sales biliares facilitan su absorción como ácidos grasos a nivel intestinal (Figs. 3-6 y 3-7). La parte más importante del metabolismo lipídico tiene lugar en el hígado, bajo un control fundamentalmente endocrino en el que intervienen la insulina, las hormonas tiroideas, la hormona de crecimiento y la adrenalina, y que también está sujeto a las características de la alimentación.

FACTORES Y SITUACIONES



Lipogénicas

- Alimentación
- Insulinemia
- Sedentarismo

Lipolíticas

- Ayuno
- Hipertiroidismo
- Ejercicio
- Hormona de crecimiento
- Agonistas β -adrenérgicos

Utilización nutritiva de las proteínas

Las proteínas están constituidas por secuencias lineales de aminoácidos con amplia variabilidad estructural y con funciones biológicas muy diversas (Tabla 3-3). A diferencia de los polisacáridos, que suelen ser polímeros repetitivos de uno o dos monómeros únicamente, casi todas las proteínas contienen series formadas por 20 aminoácidos diferentes, en el caso de las proteínas simples, mientras que las proteínas conjugadas pueden estar integradas también por metales, azúcares, ácidos, etc. Los aminoácidos denominados esenciales (fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina) no pueden ser sintetizados a través de reacciones metabólicas por el propio organismo y deben ser suministrados por la dieta.

Tabla 3-2. CLASIFICACIÓN, FUNCIONES, REQUERIMIENTOS Y FUENTES DE LÍPIDOS

Son compuestos orgánicos formados por C, H, O, insolubles en H_2O

Clasificación

1. Lípidos simples
 - Ácidos grasos: no saturados y saturados
 - Grasas neutras: triglicéridos
 - Ceras: ésteres con alcoholes de cadena larga
2. Lípidos compuestos
 - Fosfolípidos
 - Glucolípidos
 - Lipoproteínas
3. Lípidos derivados
 - Colesterol
 - Esteroides
 - Vitaminas A, D, E, K
 - Sales biliares

Funciones

- Componentes del organismo: tejido adiposo, membranas...
- Fuente de energía (9 kcal/g)
- Transporte de vitaminas
- Síntesis de nuevas moléculas: colesterol, esteroides, etc
- Aislamiento, saciedad, palatabilidad, etc.

Fuentes

- Grasas y aceites vegetales
- Embutidos, carne, pescado graso, volatería y huevo
- Productos lácteos
- Frutos secos

Requerimientos

- Ácidos linoleico y linolénico [2-6%] de la ingesta calórica
- Recomendaciones
 - 30-35% calorías de la dieta de origen lipídico
 - 7-10% ácidos grasos saturados
 - 10-15% ácidos grasos monoinsaturados
 - 8-10% ácidos grasos poliinsaturados
 - Colesterol \leq 300 mg/día

Enfermedades relacionadas

- Obesidad
- Arterioesclerosis
- Pancreatitis, hepatitis, problemas biliares
- Estearorrea

La polivalencia funcional de estos nutrientes va desde la participación en la estructura, crecimiento y fisiología celulares (papel fundamental), hasta su utilización con fines energéticos en determinadas situaciones y como reguladores del equilibrio osmótico, hídrico, ácido-base o del transporte de oxígeno (hemoglobina). También son proteínas las enzimas, algunas hormonas, la albúmina y las inmunoglobulinas, que intervienen en la regulación homeostática del organismo.

Las proteínas se degradan parcialmente por la digestión a nivel del estómago por el ácido clorhídrico y con enzimas proteolíticas como la pepsina (Figs. 3-8 y 3-9); posteriormente sufren un nuevo ataque enzimático en el intestino delgado por la tripsina y quimiotripsina pancreáticas y las peptidasas mucosales. Los aminoácidos resultantes de la digestión de las proteínas se absorben por transporte activo y difusión pasiva para finalmente alcanzar el hígado.

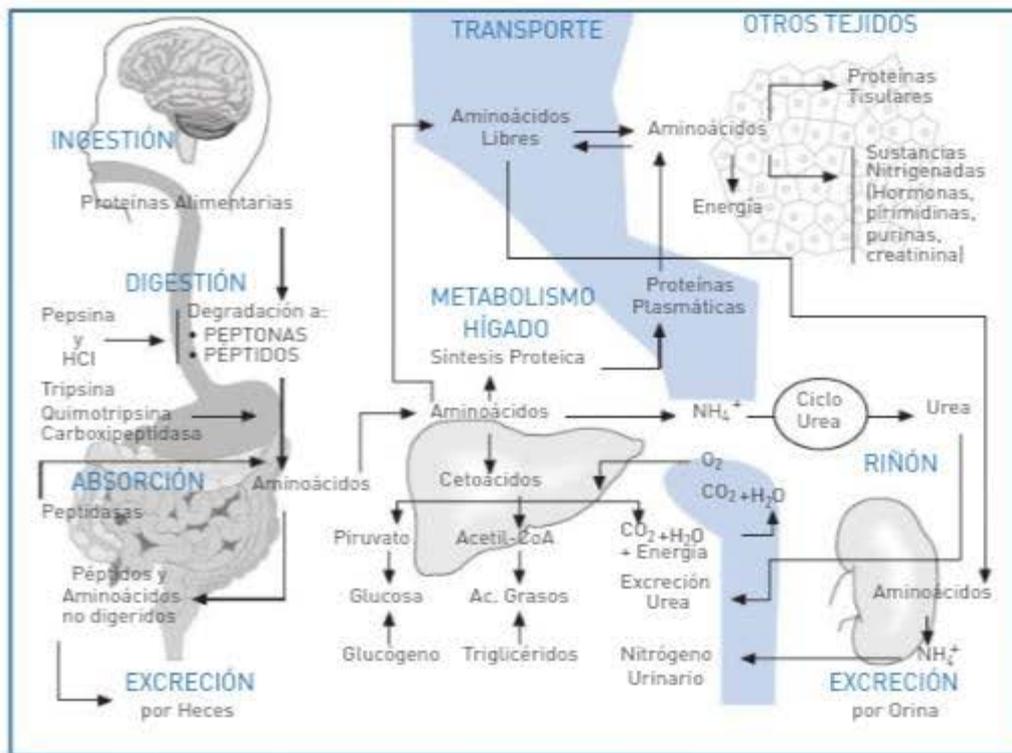


Figura 3-8. Metabolismo de las proteínas en situaciones posabsortivas.

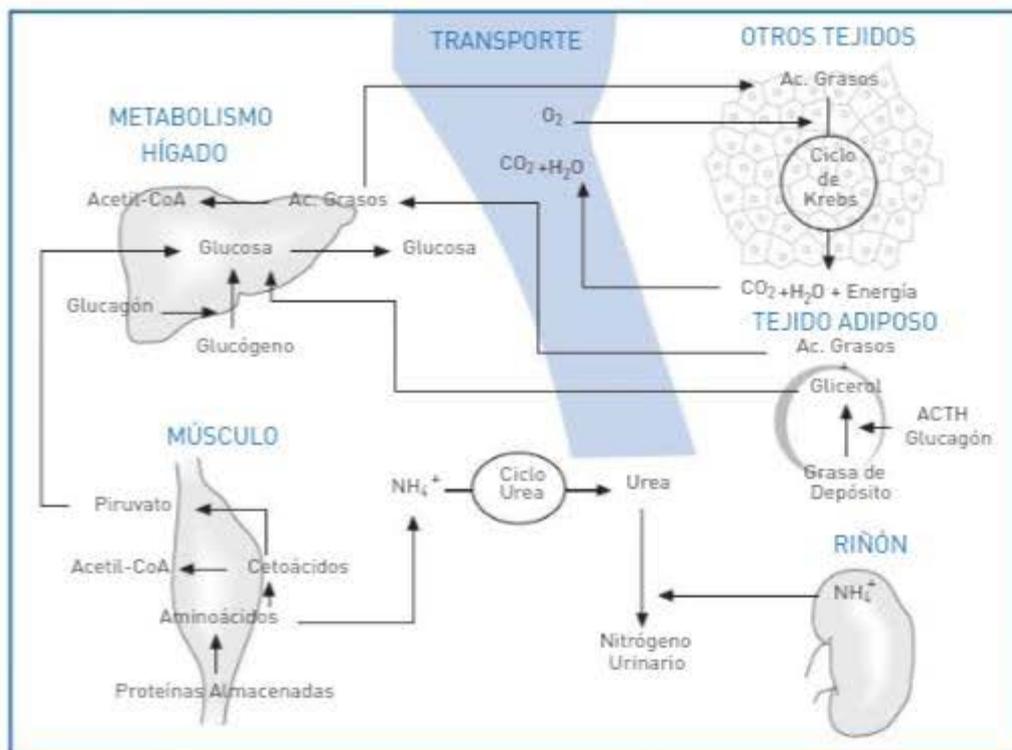


Figura 3-9. Metabolismo de las proteínas en situaciones de ayuno.

Los aminoácidos de la dieta pueden formar parte de las proteínas corporales o sufrir procesos de transaminación y desaminación en el hígado, donde pueden interconvertirse en glucosa o grasas o, alternativamente, destinarse a la obtención de energía. Los aminoácidos de la sangre o de las proteínas hepáticas y plasmáticas pueden servir de sustratos para la síntesis de proteínas tisulares, dado que en la proteína corporal existe una gran capacidad de renovación. Los procesos degradativos de las proteínas dan lugar a moléculas de amoníaco, que se eliminan por la orina, tras su integración en el ciclo de la urea. Las reacciones metabólicas propias de las proteínas están bajo un control neuroendocrino en el que participa el sistema nervioso autónomo así como la insulina, los corticoesteroides, la somatotropina, la tiroxina, etc., que pueden afectar a los procesos de síntesis y degradación proteica y son función de la nutrición (valor calórico, así como la cantidad y calidad de la proteína), el tejido específico y la situación fisiopatológica.

FACTORES Y SITUACIONES



Anabólicas

- Alimentación
- Testosterona
- Insulina
- Hormona de crecimiento
- Ejercicio

Catabólicas

- Ayuno
- Glucocorticoides
- Hormonas tiroideas

Utilización nutritiva de los minerales

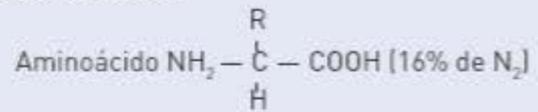
Los minerales son los elementos inorgánicos de la dieta y se caracterizan por ser esenciales para el organismo (Tabla 3-4). Es decir, porque no pueden ser sintetizados por el mismo, debiendo formar parte regularmente de la alimentación diaria. La deficiencia de minerales en la dieta provoca enfermedades carenciales específicas, que suelen corregirse con su suplementación en la misma.

Se pueden distinguir dos grupos de minerales:

- **Macrominerales**, cuya concentración en el organismo es superior al 0,005% del peso corporal. En este grupo se incluyen el calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio, cloro y azufre.

Tabla 3-3. CLASIFICACIÓN, FUNCIONES, REQUERIMIENTOS Y FUENTES DE PROTEÍNAS

Unidad estructural



Clasificación

1. Proteínas simples: albúmina, globulinas, colágeno, etc.
2. Proteínas conjugadas:
 - Lipoproteínas
 - Glucoproteínas y mucoproteínas
 - Metaloproteínas
 - Cromoproteínas
 - Fosfoproteínas
 - Nucleoproteínas
3. Proteínas derivadas

Fuentes

- De elevada calidad: carne, pescado, huevos y lácteos
- De calidad media: cereales y legumbres

Funciones

- Constituyentes estructurales del organismo y de secreciones
- Mantenimiento y crecimiento
- Aporte energético (4 kcal/g)
- Homeostasis:
 - Balance hídrico, ácido-base
 - Transporte lípidos (lipoproteínas), O₂ (Hb), ácidos grasos, vitaminas
 - Enzimas, hormonas, inmunoglobulinas.
- Síntesis compuestos nitrogenados: creatinina, bases púricas, porfirina,...

Requerimientos

- Las necesidades son función de la calidad de la proteína ingerida y situación fisiológica o patológica
- Aminoácidos esenciales (3-16 mg/kg) (His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val)
- Proteína (2,2 g/kg en lactantes, 0,8 g/kg en adultos)
- Proteína/caloría: esta relación debe representar al menos 5%. Normalmente 10-12%

Enfermedades relacionadas

- Kwarsiorokor: déficit proteína
- Marasmo: déficit proteína + energía
- Fenilcetonuria: error innato por déficit del enzima (que transforma Phe en Tyr)
- Gota: depósito de ácido úrico procedente de purinas

- **Microminerales** o elementos traza, cuya concentración en el organismo es inferior al 0,005% del peso corporal. En este grupo se incluyen elementos como el hierro, zinc, cromo, selenio, yodo, flúor, etcétera.

Los minerales participan en diferentes funciones de regulación metabólica propias de la homeostasis corporal como coenzimas, cofactores, etc. También intervienen en la regulación del balance hídrico, en el equilibrio ácido-base y en el mantenimiento de la presión osmótica.

Algunos minerales como el calcio y el fósforo son elementos estructurales del hueso y juegan funciones importantes para el organismo como la participación en la contracción muscular o en la excitabilidad nerviosa, junto al sodio, potasio y cloro (Tabla 3-5). Los microminerales suelen tener misiones específicas en el metabolismo y también participan en la respuesta inmune, en distintos sistemas enzimáticos, en el crecimiento celular, etcétera.

Utilización nutritiva de las vitaminas

Las vitaminas son un grupo heterogéneo de sustancias, caracterizado por su intervención en la regulación de diferentes reacciones metabólicas (Tabla 3-6). Estos constituyentes de los alimentos son nutrientes esenciales para el organismo, por lo que deben aportarse diariamente en la dieta (Tabla 3-7). En estados carenciales su suplementación da lugar a una reversión rápida de los síntomas de deficiencia asociados. Las distintas vitaminas se clasifican de acuerdo a su solubilidad, en dos grupos:

- **Vitaminas liposolubles**, cuyas propiedades metabólicas son:
 - Absorción mediada por sales biliares.
 - Posible almacenamiento.
 - Excreción a nivel fecal.

En este grupo se incluyen la vitamina A o anti-xeroftálmica, la vitamina D o antirraquítica, la vitamina E y la vitamina K o antihemorrágica.
- **Vitaminas hidrosolubles**, cuyas propiedades metabólicas son:
 - Absorción por difusión pasiva o transporte activo.
 - Almacenamiento bajo o nulo.
 - Excreción a nivel urinario.

En este grupo se encuentra la vitamina C o antiescorbútica y el complejo vitamínico B integrado por la tiamina o vitamina antineurítica, la riboflavina, la niacina o factor PP, la biotina, el ácido pantoténico, la piridoxina o vitamina B₆, el ácido fólico y la cobalamina o vitamina B₁₂.

La función primordial de las vitaminas es participar en el control del metabolismo lipídico, proteico, hidrocarbonado, mineral y energético, aunque algunas de ellas tienen actividades específicas. Así, la vitamina C interviene en la formación de colágeno, la vitamina A es necesaria para la visión y el crecimiento, la vitamina D es necesaria para la formación de hueso, la vitamina K participa en los procesos de coagulación sanguínea, ciertas vitaminas del complejo B (ácido fólico, B₆, B₁₂) contribuyen a la formación y maduración de los glóbulos rojos, previniendo la anemia, etc.

Utilización nutritiva del agua

El agua es necesaria para la vida, participando en funciones estructurales, reguladoras del equilibrio ácido-base, osmótico, etc. y otras reacciones celulares, así como en el mantenimiento de la temperatura corporal. El organismo dispone de varios mecanismos neuroendocrinos que permiten controlar el volumen y la composición de los fluidos corporales. Las demandas se estiman en 1 ml/kcal.

Utilización nutritiva del alcohol

El alcohol presente en las bebidas alcohólicas es una sustancia liposoluble e hidrosoluble y es absorbido fácilmente a través de la membrana celular. Así, el alcohol se absorbe tanto a nivel del estómago como del intestino y pasa rápidamente a la sangre.

La ingesta de alcohol puede interferir con la ingesta de otros nutrientes energéticos, ya que aporta 7,1 kcal/g siendo éste prácticamente su único valor nutritivo.

El alcohol se metaboliza a nivel hepático por medio de la alcohol-deshidrogenasa y la acetaldehído-deshidrogenasa, que lo transforman en acetilcoenzima A que puede ser empleado como sustrato energético o en la síntesis de ácidos grasos, etcétera.

La eliminación de alcohol tiene lugar a través de los pulmones (CO₂) y de la orina (H₂O) en función de la alcoholemia, tras su utilización metabólica.

Tabla 3-4. LOS MINERALES

Mineral	Contenido en adultos (g)	Fuentes dietéticas	Principales funciones en el organismo	Deficiencia	Exceso
Calcio	1.500 hueso (99%)	Leche, queso, verduras, legumbres secas	Formación de huesos y dientes Coagulación de la sangre Transmisión nerviosa	Crecimiento detenido, raquitismo, osteoporosis, convulsiones	No grave en el hombre
Fósforo	860 hueso (80%)	Leche, queso, carne, volatería, cereales	Formación de huesos y dientes Equilibrio ácido-base	Debilidad, desmineralización del hueso Pérdida de calcio	Erosión de la mandíbula (mandíbula porosa)
Azufre	300 pelo, piel	Aminoácidos sulfurados (metionina y cisteína) presentes en las proteínas de la dieta	Constituyente de sustancias titulares activas de cartílagos y tendones	Relacionado con la ingestión y deficiencia de aminoácidos sulfurados.	Un exceso de ingestión de aminoácidos sulfurados conduce a un crecimiento escaso
Potasio	180 Liq. intracelular	Carnes, leche, muchas frutas	Equilibrio ácido-base Equilibrio hídrico del cuerpo Función nerviosa	Debilidad muscular Parálisis	Debilidad muscular Muerte
Cloro	74 Liq. extracelular	Sal común	Formación de jugo gástrico Equilibrio ácido-base	Calambres musculares Apatía mental Reducción del apetito	Vómitos
Sodio	64 hueso, Liq. extracelular	Sal común	Equilibrio ácido-base Equilibrio hídrico del cuerpo Función nerviosa	Calambres musculares Apatía mental Reducción del apetito	Elevada tensión sanguínea

Tabla 3-4. LOS MINERALES (cont.)

Mineral	Contenido en adultos (g)	Fuentes dietéticas	Principales funciones en el organismo	Deficiencia	Exceso
Magnesio	25 hueso	Cereales integrales verduras de hoja verde	Activa las enzimas, interviene en la síntesis proteica	Fallos en el crecimiento Alteraciones del comportamiento Debilidad, espasmos	Diarrea
Hierro	4,5 Hb (75%)	Huevos, carnes magras, legumbres, cereales integrales, verduras	Constituyente de la hemoglobina y de enzimas que intervienen en el metabolismo energético	Anemia ferropénica (debilidad, menor resistencia a las infecciones)	Siderosis, cirrosis hepática
Flúor	2,6 dientes, hueso	Agua de bebida, té, café	Puede ser importante para el mantenimiento de la estructura de los huesos	Mayor frecuencia de pérdida de los dientes	Dientes moteados, aumento de la densidad del hueso Alteraciones neurológicas
Zinc	2 tejido	Ampliamente distribuido en los alimentos	Constituyente de las enzimas implicadas en la digestión	Fallos en el crecimiento Deficiencia glándula sexual	Fiebre, náuseas, vómitos, diarrea
Cobre	1	Carnes, agua de bebida	Constituyente de enzimas asociadas con el metabolismo del hierro	Anemia, alteraciones óseas (raras en el hombre)	Cuadro metabólico raro (enfermedad de Wilson)
Silicio Vanadio Estaño Níquel	0,024 0,018 0,017 0,01	Ampliamente distribuidos en los alimentos	Función desconocida (esenciales para los animales)	No registrada para el hombre	Enfermedades profesionales: Silicio: silicosis Vanadio: irritación pulmón Estaño: vómitos Níquel: neumonía aguda

Tabla 3-4. LOS MINERALES (cont.)

Mineral	Contenido en adultos (g)	Fuentes dietéticas	Principales funciones en el organismo	Deficiencia	Exceso
Selenio	0,013	Mariscos, carnes y cereales	Funciones relacionadas estrechamente con la vitamina E	Anemia (rara)	Desórdenes gastrointestinales, irritación pulmonar
Manganeso	0,012	Ampliamente distribuido en los alimentos (sobre todo vegetales)	Constituyente de enzimas que intervienen en la síntesis de grasas	En los animales: crecimiento deficiente, alteraciones del sistema nervioso, anomalías en la reproducción	Envenenamiento en las minas de manganeso: enfermedad generalizada del sistema nervioso
Yodo	0,011 tiroides	Pescados y mariscos, productos lácteos, verduras	Constituyentes de las hormonas tiroideas	Bocio (tiroides hipertrofiado)	La ingestión de cantidades muy elevadas disminuye la actividad tiroidea
Molibdeno	0,009	Legumbres, cereales, menudillos	Constituyente de algunas enzimas	No registrada en el hombre	Inhibición de enzimas
Cromo	0,006	Grasas, aceites vegetales, carnes, agua	Interviene en el metabolismo de la glucosa y energético	Fallos en la capacidad de metabolización de la glucosa	Enfermedades profesionales: daños en la piel y riñones
Cobalto	0,0015	Carne y menudillos, leche	Constituyente de la vitamina B ₁₂	No registrada en el hombre	Enfermedad profesional: dermatitis y enfermedad eritrocitaria
Agua	40.000 [60% del peso corporal]	Alimentos sólidos, líquidos, agua de bebida	Transporte de nutrientes Regulación de la temperatura Participa en las reacciones metabólicas	Sed, deshidratación	Dolores de cabeza, náuseas Edema Tensión sanguínea elevada

Tabla 3-5. CLASIFICACIÓN, FUNCIONES, REQUERIMIENTOS Y FUENTES DE MINERALES

Nutrientes que son los elementos químicos en su forma inorgánica, y que comportan las siguientes propiedades:

- Son esenciales y deben ser incluidos en cantidades adecuadas en la dieta (en general muy pequeñas).
- Su ausencia origina estados deficitarios específicos, que son corregidos por su adición a la dieta.
- Su concentración en los distintos tejidos suele ser semejante en diferentes especies.

Clasificación

- Macronutrientes (> 0,005% peso corporal): Ca, P, Mg, Na, K, Cl, S.
- Micronutrientes (< 0,005 % peso corporal): Fe, Zn, F, I, Co,...

Funciones generales

- Estructura ósea y dental.
- Regulación balance hídrico, ácido-base, presión osmótica.
- Componentes de enzimas, cofactores, etc., del metabolismo intermediario.
- Excitabilidad nerviosa, contracción muscular, transporte.

Recomendaciones

- Ca, P, Mg, Na, Cl, K, S > 100 mg/día.
- Zn, Fe, I, F, Cu, Co, Cr < 20 mg/día.
- Si, Sn, Mo, Va, Mn... (trazas).

Fuentes

- En numerosos alimentos y bebidas.

Tabla 3-6. LAS VITAMINAS

Vitaminas (sinónimo)	Fuentes dietéticas	Principales funciones en el organismo	Deficiencia	Exceso
Hidrosolubles				
Vitamina B ₁ (tiamina) (antineurítica)	Cerdo, menudillos, cereales integrales, legumbres	Coenzima [tiaminpirofosfato] de reacciones de descarboxilación	Beri-beri (cambios en los nervios periféricos, edema, fallo cardíaco)	Ninguno registrado importante
Vitamina B ₂ (riboflavina)	Ampliamente distribuida en los alimentos. Principalmente en leche, pescados y huevos	Constituyente de dos coenzimas flavin-nucleotídicos que intervienen en el metabolismo energético (FAD y FMN)	Labios enrojecidos, fisuras en los bordes de la boca (queilosis), lesiones oculares	Ninguno registrado importante
Vitamina B ₃ (niacina) (factor PP)	Ampliamente distribuida en los alimentos. Los alimentos más ricos son vísceras, pescados y leguminosas (puede sintetizarse a partir de triptófano)	Constituyente de dos coenzimas que intervienen en reacciones de óxido-reducción (NAD y NADP)	Pelagra (lesiones cutáneas y gastrointestinales, desórdenes nerviosos y mentales)	Sonrojamiento, quemazón y picores alrededor del cuello, cara y manos
Vitamina B ₆ (piridoxina)	Carnes, verduras, cereales integrales, legumbres y yema de huevo	Coenzima (fosfato de piridoxal) que interviene en el metabolismo de aminoácidos	Irritabilidad, convulsiones, temblores musculares, dermatitis periorcarias, litiasis renal	Ninguno registrado importante
Acido pantoténico (vitamina B ₅)	Ampliamente distribuido en los alimentos	Constituyente de la coenzima A, que desempeña un papel central en el metabolismo energético	Fatiga, trastornos del sueño, fallos de coordinación, náuseas (rara en el hombre)	Ninguno registrado importante

Tabla 3-6. LAS VITAMINAS (cont.)

Vitaminas	Fuentes dietéticas	Principales funciones en el organismo	Deficiencia	Exceso
Acido fólico (vitamina B ₉)	Hígado, legumbres, verduras verdes, productos de trigo integral	Coenzima [reducida] que interviene en la transferencia de unidades individuales de carbono en el metabolismo de aminoácidos y ácidos nucleicos	Anemia, anomalías gastrointestinales, diarrea, lengua roja	Ninguno registrado importante
Vitamina B ₁₂ (cobalamina)	Carnes, hígado, huevos, productos lácteos No presente en alimentos de origen vegetal	Coenzima que interviene en la transferencia de grupos metilo en el metabolismo, síntesis de ácidos nucleicos	Anemia perniciosa, desórdenes neurológicos	Ninguno registrado importante
Biotina (vitamina H) (vitamina B ₇)	Legumbres, verduras, carnes	Coenzima necesaria para la síntesis de grasas, metabolismo de los aminoácidos y formación de glucógeno (almidón animal)	Fatiga, depresión, náuseas, dermatitis, dolores musculares	Ninguno registrado importante
Vitamina C (ácido ascórbico) (antiescorbútica)	Cítricos, tomates, pimientos verdes, lechuga, patata, hortalizas	Mantiene la matriz del cartilago, hueso y dentina Importante para la síntesis del colágeno	Escorbuto (degeneración de la piel), dientes, vasos sanguíneos, hemorragias epiteliales	Relativamente atóxica Posibilidad de litiasis renal
Liposolubles				
Vitamina A (retinol) (antixeroflátmica)	Provitamina A (betacaroteno) ampliamente distribuida en los vegetales verdes, rojos y anaranjados El retinol está presente en la leche, mantequilla, quesos, nata, hígado, margarina enriquecida	Constituyente de la rodopsina (pigmento visual) Mantenimiento de los tejidos epiteliales Desempeña un papel importante en la síntesis de mucopolisacáridos	Xeroftalmia (queratinización del tejido ocular), ceguera nocturna, ceguera permanente	Dolor de cabeza, vómitos, descamación de la piel, anorexia, hinchazón de los huesos largos

Tabla 3-6. LAS VITAMINAS (cont.)

Vitaminas	Fuentes dietéticas	Principales funciones en el organismo	Deficiencia	Exceso
Vitamina D (antirraquitica)	Aceite de hígado de bacalao, huevos, productos lácteos, leche enriquecida y margarina	Promueve el crecimiento y mineralización de los huesos Aumenta la absorción de calcio	Raquitismo (deformidades óseas) en niños Osteomalacia en adultos	Vómitos, diarrea, pérdida de peso, trastornos renales
Vitamina E (tocoferoles)	Semillas, vegetales de hojas verdes, margarina, aceites	Actúa como un antioxidante evitando daños a la membrana celular	Posiblemente anemia	Relativamente atóxica
Vitamina K (filoquinona) (antihemorrágica)	Verduras de hojas verdes, salvado de trigo, hígado, queso, mantequilla, huevo	Importante para la coagulación de la sangre (interviene en la formación de protrombina activa)	Deficiencias condicionadas asociadas con graves hemorragias. Hemorragias internas	Relativamente atóxica. Las formas sintéticas a altas pueden provocar ictericia

Tabla 3-7. CLASIFICACIÓN, FUNCIONES, REQUERIMIENTOS Y FUENTES DE VITAMINAS

Este grupo de nutrientes engloba moléculas orgánicas muy diferenciadas entre sí y que reúnen las siguientes características:

- Son necesarias en muy pequeñas cantidades para crecimiento y función.
- Su ausencia en la dieta origina estados carenciales específicos subsanados con inclusión en la dieta.
- Deben estar incluidas en la dieta, ya que el organismo no las puede sintetizar, o lo hace en cantidades insuficientes.

Clasificación

Hidrosolubles

- Absorción: transporte activo y difusión.
- Almacenamiento: pequeño o nulo.
- Excreción: por orina.
- Incluye el complejo B y vitamina C.

Liposolubles

- Absorción: mediada por sales biliares.
- Almacenamiento: en hígado, depósitos grasos.
- Excreción: fecal.
- Incluyen las vitaminas A, D, E y K.

Requerimientos

- Variable de μg a mg.

Funciones generales

- Regulación del metabolismo hidrocarbonado, lipídico y proteico.
- Regulación del metabolismo mineral.

Balance energético: peso y composición corporal

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

1. Definir los conceptos de caloría, metabolismo, consumo y balance energético.
2. Valorar el metabolismo energético y la tasa metabólica basal en individuos.
3. Identificar los factores que modifican el cálculo de la tasa metabólica basal y del balance energético.
4. Clasificar los comportamientos corporales y evaluar la composición corporal de un individuo.
5. Descubrir los métodos de evaluación de la composición corporal.

VALOR ENERGÉTICO DE LOS ALIMENTOS

La energía, definida como la capacidad para realizar un trabajo, se puede obtener a partir de los hidratos de carbono, lípidos, proteínas y del alcohol presentes en los alimentos y bebidas.

Las unidades tradicionales de medida de la energía o valor calórico de los alimentos son las kilocalorías (kcal), popularmente conocidas como calorías (cal), que representan la cantidad de calor necesario para elevar la temperatura de un kilogramo de agua en 1°C. Actualmente, los científicos tienden a utilizar los kilojulios (kJ). Así, 1 kcal equivale a 4,2 kJ (1 kJ = 0,24 kcal).

La energía bruta de un alimento depende de su contenido en nutrientes energéticos y puede determinarse a partir de una bomba calorimétrica (Fig. 4-1), que cuantifica el calor producido por la combustión de los nutrientes en presencia de oxígeno según la ecuación:



La cantidad de calor liberada en la oxidación de glúcidos, grasas y alcohol, en la bomba calorimétrica (calor de combustión) es prácticamente equivalente

a la energía obtenida por el organismo (calor fisiológico de combustión), mientras que la oxidación de las proteínas, a nivel celular, es incompleta. En este último caso, se produce también urea y amoníaco como productos finales en el organismo. Dado que estos productos contienen energía, en el caso de las proteínas el calor fisiológico de combustión es menor que el calor de combustión.

El valor calórico bruto, medido con la bomba calorimétrica (calor de combustión), para diferentes hidratos de carbono oscila entre 3,9 y 4,2 kcal/g, en las proteínas entre 5,2 y 5,9 kcal/g y en los lípidos entre 9,2 y 9,5 kcal/g, mientras que el alcohol aporta 7,1 kcal/g (Tabla 4-1).

La estimación del valor energético de los nutrientes y del alcohol, útil desde el punto de vista nutritivo, debe considerar la fracción digestible en el alimento o pérdidas en las heces y las pérdidas de energía en la orina, por lo que se han establecido los valores fisiológicos de combustión o de energía metabolizable para las proteínas e hidratos de carbono en 4 kcal/g, para las grasas en 9 kcal/g y para el alcohol en 7 kcal/g, que son los valores más ampliamente utilizados en la práctica.

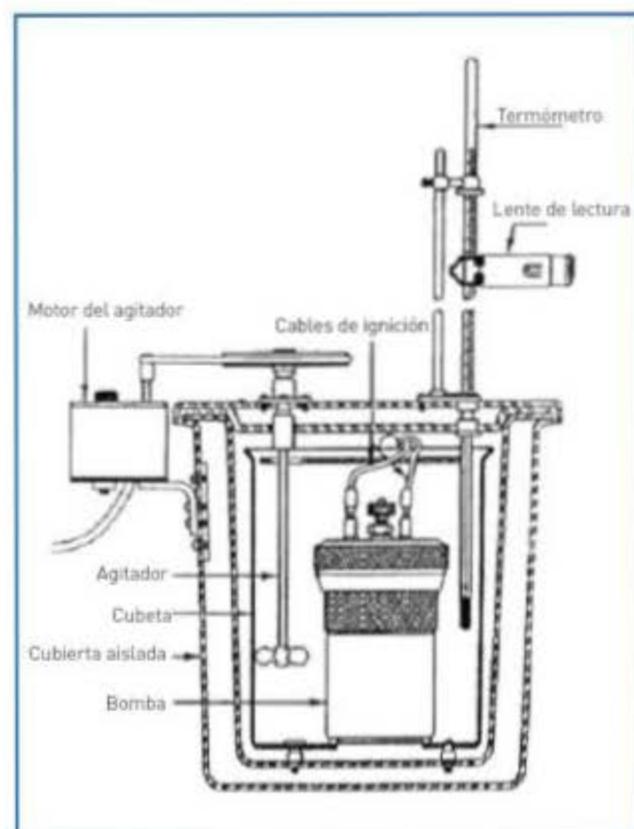


Figura 4-1. Bomba calorimétrica.



Energía digestible aparente (DE): energía bruta menos la energía fecal (valor calórico de nutrientes no absorbidos y perdidos en las heces). Este término se ha establecido debido a que el tracto gastrointestinal no digiere y absorbe totalmente todos los componentes presentes en los alimentos. La digestibilidad de los nutrientes varía entre el 92% para las proteínas, el 95% para las grasas y el 97% para los glúcidos, mientras que para el alcohol es prácticamente completa (100%).

Energía metabolizable (ME): energía digestible menos la energía perdida en la orina debido a un aprovechamiento incompleto de los nutrientes. La energía remanente en la orina que procede del metabolismo de las grasas e hidratos de carbono, es de poca importancia, mientras que la energía perdida por el metabolismo incompleto de las proteínas es del orden de 1,25 kcal/g y es atribuible fundamentalmente al valor calórico del amoníaco y de la urea eliminados en la orina.

Energía neta (NE): incremento térmico o coste energético asociado a la utilización de los alimentos; energía metabolizable menos pérdidas en forma de calor.

Tabla 4-1. CALOR DE COMBUSTIÓN Y ENERGÍA BIOLÓGICAMENTE DISPONIBLE

Alimento	Calor de combustión (kcal/g)	Absorción (%)	Pérdida en orina (kcal/g)	Factor de Atwater
Proteínas	5,6	92	1,25	4
Hidratos de carbono	4,1	99	-	4
Lípidos	9,4	95	-	9
Alcohol	7,1	100	Trazas	7

METABOLISMO ENERGÉTICO

Las reacciones de transformación de la energía procedente de los alimentos, en los que también intervienen minerales y vitaminas, tienen lugar en los distintos compartimentos celulares y

se destinan al mantenimiento de las funciones corporales (actividad cardio-respiratoria, excitabilidad nerviosa, contracción muscular, producción láctea, crecimiento celular, etc.), a las actividades físicas, al aprovechamiento y a la utilización de los nutrientes (digestión, absorción, metabolismo, excreción y almacenamiento de sustratos de reserva), y una parte importante se disipa en forma de calor. En cualquier caso, a pesar de estas pérdidas como calor, el organismo puede considerarse como un sistema de muy alto rendimiento en la transformación de energía.

Evaluación del metabolismo energético

La utilización de la energía presente en los alimentos por el organismo puede estimarse a través de medidas de calorimetría directa con equipos herméticos y aislados térmicamente, que permiten determinar el calor producido en unas circunstancias determinadas, ya que el organismo humano es un sistema termodinámico que cumple la ley de la conservación de la energía (la energía no se crea ni se destruye, sino que se transforma). La medida directa del metabolismo energético supone la aplicación de una metodología muy laboriosa y compleja, y por tanto, no utilizable rutinariamente. La gran concordancia de valores que se obtiene utilizando otros procedimientos hace que su uso quede restringido a programas de investigación.

Por otra parte, a través de la denominada calorimetría indirecta, basada en el hecho de que la combustión de los nutrientes consume una cantidad de oxígeno proporcional a la cantidad de energía liberada en forma de calor, también se puede evaluar el gasto energético. Así, el equivalente calórico de oxígeno es 4,825 kcal/L en una dieta mixta. Este factor es una media ponderada de los valores calóricos que se obtienen al oxidar hidratos de carbono, lípidos y proteínas, teniendo en cuenta que la dieta habitual contiene 10-15% de la energía en forma de proteína, 50-60% en forma de hidratos de carbono y 30-40% en forma de grasa y que la mezcla de nutrientes oxidada es semejante a la mezcla de nutrientes de la dieta habitual. La determinación del consumo de oxígeno puede realizarse con equipos sencillos, en los que la estimación se realiza por diferencia de

volúmenes (respirómetro) o bien con instrumentos que cuantifican directamente, tanto el O_2 consumido como el CO_2 producido.

El hecho de que en los procesos del metabolismo energético se produce anhídrido carbónico en la combustión de los nutrientes, en presencia de oxígeno, ha permitido definir el cociente respiratorio (CR) como la relación entre el anhídrido carbónico producido y el oxígeno consumido. Este cociente es función de la proporción de hidratos de carbono, lípidos, proteínas y alcohol consumidos en la dieta.

El metabolismo de 1 gramo de almidón en el organismo consume O_2 en volúmenes semejantes al CO_2 producido, por lo que el cociente respiratorio es la unidad, siendo el rendimiento energético máximo de esta reacción potencialmente destinado a la obtención de ATP (36 moles/mol glucosa) del orden del 40%.

La producción de anhídrido carbónico en la oxidación de las grasas es menor que el consumo de oxígeno, con un valor medio de coeficiente respiratorio estimado en 0,71 y el porcentaje máximo de conversión de la energía en ATP (130-150 moles ATP/mol) a partir de los lípidos también es aproximadamente del 40%. El coeficiente respiratorio para las proteínas está establecido en 0,81, por tanto con mayor consumo de oxígeno que producción de anhídrido carbónico, con una eficiencia de transformación en ATP (20-30 moles ATP/mol proteína) no superior al 35%.

El coeficiente respiratorio permite, en algunos casos, conocer posibles trastornos en su utilización dietética y estimar el porcentaje de los nutrientes energéticos de la dieta.

Metabolismo energético en situaciones específicas

En reposo, el organismo obtiene energía fundamentalmente por oxidación de grasas con un bajo consumo de hidratos de carbono; sin embargo, al comienzo del ejercicio y durante un ejercicio prolongado, las proporciones de glucosa, ácidos grasos y otros sustratos energéticos consumidos, pueden modificarse en función de la duración, intensidad y tipo de actividad, así como del entrenamiento y la dieta previa seguida.

En situaciones de ayuno o restricción calórica, el organismo depende de sus propios depósitos ener-

géticos. Así, en períodos de ayuno de 12-18 horas, el organismo utiliza inicialmente la glucosa y los ácidos grasos circulantes en la sangre así como el glucógeno hepático y muscular (glucogenolisis), como fuentes de energía. Posteriormente, si el ayuno se prolonga, el organismo obtiene energía a partir de aminoácidos, que se utilizan directamente como sustratos energéticos o tras sufrir procesos de gluconeogénesis, o a partir de triglicéridos acumulados en el tejido adiposo, que sufren reacción de β -oxidación y se integran en el ciclo de Krebs. Una utilización prolongada de lípidos como fuente energética, conduce a la aparición de cuerpos cetónicos con una reducción de la utilización de glucosa.

La obesidad se presenta, por el contrario, como consecuencia de una acumulación de sustratos energéticos, fundamentalmente como grasa, que no han sido utilizados para la obtención de energía y se almacenan en el organismo como triglicéridos en el tejido adiposo.

CONSUMO ENERGÉTICO: DEFINICIÓN Y COMPONENTES

Las funciones vitales del organismo requieren un determinado gasto energético, que debe ser compensado por los alimentos y bebidas de la dieta. Así, las necesidades energéticas se definen como la cantidad de energía necesaria para mantener la salud, el crecimiento y un nivel apropiado de actividad física.

En situaciones de equilibrio, el ajuste entre la energía ingerida con los alimentos y el consumo energético diario se alcanza a través de diferentes mecanismos neuroendocrinos hipotálamo-hipofisarios que regulan con gran precisión el apetito, evitando grandes fluctuaciones en el peso a lo largo del tiempo y, por tanto, la desnutrición calórica y la obesidad.

La energía metabolizable o valor fisiológico de combustión de los alimentos, puede disiparse en forma de calor (aproximadamente 50%), emplearse en el aprovechamiento y asimilación de los nutrientes (6-10%) y utilizarse en actividades físicas o funciones fisiológicas o acumularse en forma de grasa (25-45%). La energía neta obtenida a partir de los alimentos tras las pérdidas a través de las heces, la orina o en forma de calor puede destinarse, fundamentalmente a cubrir el metabolismo basal, la actividad física y a la acción termogénica de los alimentos.

En ciertas circunstancias, una parte del aporte energético de la dieta también se puede destinar al crecimiento de estructuras corporales, la producción de leche (lactancia) o el desarrollo del feto durante el embarazo. La actividad mental aparentemente no influye sobre el gasto energético. El gasto energético global depende entre otros factores de la edad, el sexo y la actividad desarrollada.

Metabolismo basal: cálculo

El metabolismo basal (MB) o energía basal, que constituye normalmente la fracción más importante del gasto energético total (60-70%), es aquella fracción del gasto energético destinada al mantenimiento de las funciones vitales y que se emplea fundamentalmente en procesos de transporte activo, que participan en diversas funciones como la actividad cardiorespiratoria, la excreción, el mantenimiento de la temperatura corporal, la ampliación y transmisión de señales, el mantenimiento del tono muscular, etc., así como en procesos de biosíntesis de biomoléculas. La determinación del metabolismo basal por calorimetría, se debe realizar en la persona despierta y en reposo físico y mental, tras un período de ayuno de 8-12 horas y en condiciones ambientales adecuadas (temperatura de 20-25 °C), expresándose en kcal/24 horas.

Cuando la determinación se realiza siguiendo las condiciones señaladas pero sin ayuno, el gasto energético que recibe el nombre de metabolismo energético de reposo, incluye la energía necesaria para llevar a cabo el aprovechamiento digestivo y metabólico de los nutrientes (Fig. 4-2).

El cálculo del metabolismo basal, cuando no se dispone de equipo apropiado (espirómetro) para su evaluación directa, puede hacerse a través de diferentes ecuaciones.

a) Ecuación de Harris-Benedict

$$\text{MB (kcal/día varón)} = 66,47 + (13,75 \times \text{kg}) + (5,0 \times \text{cm}) - (6,74 \times \text{años})$$

$$\text{MB (kcal/día mujer)} = 655,1 + (9,56 \times \text{kg}) + (1,85 \times \text{cm}) - (4,68 \times \text{años})$$

b) Ecuación de Brody-Klieber

$$\text{MB (kcal/día)} = 70 \text{ P}^{0,75} (\text{kg})$$

c) Ecuación de estimación rápida

$$\text{Varón: MB} = 1 \text{ kcal/kg/h} \quad \text{Mujer: MB} = 0,9 \text{ kcal/kg/h}$$

Además, existen nomogramas que permiten evaluar el metabolismo basal en función de la superficie corporal.

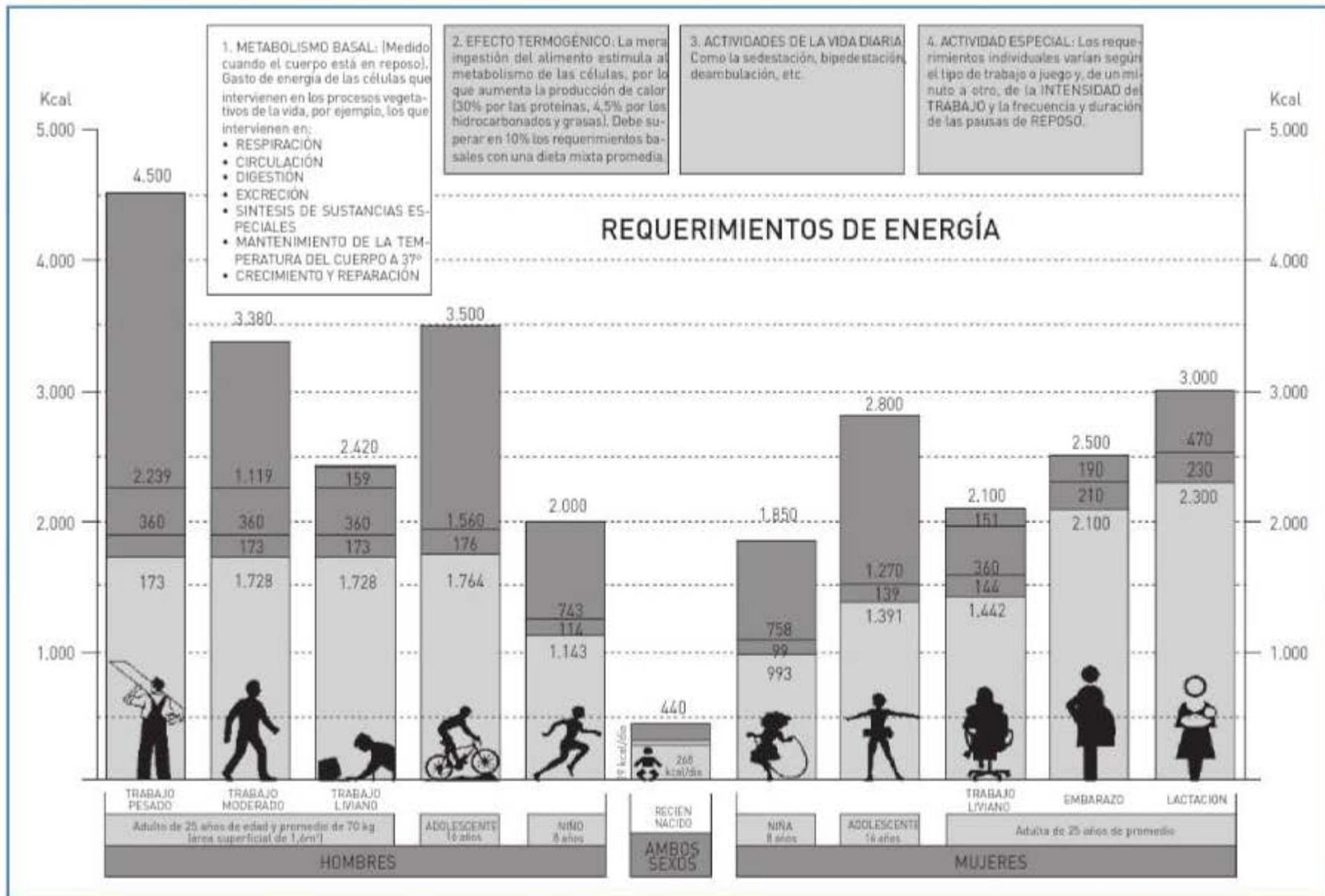


Figura 4-2. Gasto energético.

Entre los factores que aumentan el metabolismo basal están el peso y la altura, la superficie corporal, el tono muscular, la fiebre (13% por cada °C superior a 37 °C) y el embarazo (13% por cada kg extra de peso), mientras que disminuye con la edad (aproximadamente 2% por cada década a partir de los 20 años).

Por otra parte, otros factores que también influyen en el metabolismo basal son el sexo (varón > mujer), la composición corporal (el tejido muscular es más activo metabólicamente que el tejido adiposo) y el balance neuroendocrino (las hormonas tiroideas y la adrenalina aumentan el metabolismo basal).

Actividad física

El segundo componente del consumo energético global es la actividad física, pudiendo representar del 20 al 40%. Esta se suele clasificar en diferentes categorías en función de la actividad cardíaca o respiratoria que generan, a través del consumo de oxígeno, aunque en su estimación siempre existe un cierto componente subjetivo. De acuerdo con estos criterios, el gasto energético para diferentes niveles de actividad se ha estimado en menos de 2,5 kcal/min para actividad sedentaria, entre 2,5 y 5 kcal/min para actividad ligera, entre 5 y 7,5 kcal/min para actividad moderada, entre 7,5 y 10 kcal/min para actividad pesada y superior a 10 kcal/min para actividad muy pesada, respectivamente. La energía destinada a la actividad física depende por tanto de la naturaleza de la propia actividad pero también de la edad, el peso corporal, el sexo y el clima.

También existen tablas en las que se asignan valores en kcal/kg/hora para diferentes actividades o a través de equivalentes metabólicos (MET) que son múltiplos del MB, dependientes de la actividad desarrollada. La evaluación personalizada del consumo energético atribuible a una cierta actividad, puede determinarse directamente con espirómetros portátiles o de campo, que valoran el consumo de oxígeno en diferentes situaciones. Evidentemente, la proporción de energía destinada a la actividad física es muy variable de unas personas a otras.

Acción termogénica de los alimentos

El tercer componente del gasto energético es la acción termogénica de los alimentos, o termogé-

sis inducida por la dieta (TID). La termogénesis obligatoria es la energía empleada en la digestión, absorción, distribución, metabolismo, almacenamiento y excreción y almacenamiento de los nutrientes ingeridos. En una dieta mixta, la termogénesis inducida por los alimentos no es superior al 10% del gasto energético total, siendo las proteínas las que conllevan la mayor parte de consumo por termogénesis inducida, frente a valores intermedios de los glúcidos y menores de los lípidos.

Existe además una termogénesis, o disipación del calor, facultativa o adaptativa que puede estar inducida por diversos factores, entre los que se encuentra la dieta. Este proceso está controlado por el sistema nervioso simpático y las proteínas desacoplantes.



CONSUMO TOTAL DE ENERGÍA

El cálculo de las necesidades totales de energía se obtiene a partir del consumo destinado al metabolismo basal, la actividad física y la acción termogénica de los alimentos. Las tablas de recomendaciones energéticas establecidas por diferentes organismos e instituciones para personas-tipo, en función de la actividad desarrollada, la edad, el sexo, la situación fisiopatológica (embarazo o lactancia), etc., o a través de nomogramas, sirven para estimar el gasto energético de forma individualizada.

BALANCE ENERGÉTICO: CRITERIOS METABÓLICOS

El balance entre la energía ingerida (EI) y la energía consumida (EC) es el factor determinante del peso corporal (P) en los adultos y afecta al tamaño de los depósitos grasos de tejido adiposo:

$$(+/-) \text{ Incremento peso} = EI - EC$$

En cuanto a la energía, suele considerarse que, una vez fijado el nivel de peso corporal y actividad física, y definida la tasa adecuada de crecimiento, sólo hay una cantidad de ingesta con la que se puede lograr el balance energético adecuado, y en consecuencia, esa cantidad se convierte en la necesidad de energía del individuo. Aunque es posible cierto grado de adaptación, es probable que el margen sea bastante estrecho. Si la energía ingerida está por encima o por debajo de las necesidades, en la

forma definida, es de esperar una modificación en las reservas de energía orgánica, a menos que el gasto energético cambie paralelamente. Si el gasto no cambia, las reservas de energía, sobre todo en forma de tejido adiposo, aumentarán o disminuirán, según la ingesta supere las necesidades o no alcance a satisfacerlas, respectivamente.

Este balance está controlado por mecanismos nerviosos a través de los centros hipotalámicos del hambre y la saciedad, por la eficacia de la utilización y producción de ATP y por la liberación del calor, así como por el balance endocrino, ya que algunas hormonas pueden inducir modificaciones sobre el apetito y la utilización energética.

Las desviaciones en el balance energético, tanto a nivel de la ingesta de nutrientes como en su gasto, por el organismo, pueden ser de diferente etiología u origen; sin embargo, en todas ellas se producen variaciones en el peso (aumento o disminución) y se acompañan de cambios en la composición corporal. Por otra parte, la ingesta desproporcionada de nutrientes energéticos en relación al gasto, induce alteraciones en el peso de una magnitud diferente a la meramente atribuible al desequilibrio calórico. Al parecer, el organismo dispone de mecanismos de adaptación, fundamentalmente ligados a la grasa parda y a la hiperproducción de hormonas tiroideas y somatotropina, que tienden a regular las pérdidas en forma de calor, lo cual brinda un cierto apoyo científico a algunos tipos de obesidad de origen metabólico.

Las ganancias o pérdidas de peso provocadas por un desequilibrio (por exceso o defecto respectivamente) en la ingesta de nutrientes energéticos se acompañan fundamentalmente, pero no exclusivamente, de variaciones en los depósitos grasos. Así, se acepta que cada kilogramo de tejido adiposo implicado en el exceso o defecto, equivale en promedio a 7.700 kcal, aunque dependiendo de la composición del tejido graso ganado o perdido puede oscilar entre 2.100 y 8.250 kcal.

PESO Y COMPOSICIÓN CORPORAL: EVALUACIÓN

El peso es una medida rápida y representativa del estado nutritivo de una persona, que puede medirse con equipos muy sencillos (balanza). El establecimiento del peso saludable o deseable es difícil, por lo que se recurre a estimaciones pobla-

cionales, en las que se relaciona el peso en función de la altura y complexión con las tasas de morbilidad y mortalidad. Algunas de estas estimaciones han sido elaboradas por diferentes compañías de seguros y organismos públicos.

Una posible interpretación de los valores de peso consiste en considerar situaciones de obesidad cuando se sobrepasa en un 20% el peso promedio ajustado a la altura y complexión. Otra forma de evaluar el peso en relación con la altura es el índice de Quetelet o índice de masa corporal (BMI) obtenido como el cociente entre el peso (kg) y la altura (m) elevada al cuadrado, ya que este valor está estrechamente correlacionado con los depósitos grasos del organismo. La interpretación más universalmente aceptada de esta relación es aquella en la que valores entre 18,5 y 24,9 son indicativos de normalidad clínica, valores entre 25 y 29,9 indican sobrepeso y valores por encima de 30 son asignados a situaciones de obesidad, mientras que valores por debajo de 18,5 ponen de manifiesto situaciones de peso insuficiente.

La composición corporal depende de diferentes factores como la edad y el sexo. También puede verse afectada por el ejercicio físico, que favorece el depósito de proteínas y la reducción de los depósitos grasos, así como por ciertas alteraciones hormonales.

El organismo humano está formado fundamentalmente por agua (50-70%), proteínas (12-20%), grasa (10-30%), minerales (5-10%) e hidratos de carbono (1-2%). La mujer tiene mayor proporción de grasa que el varón y menor contenido en proteína. Con el aumento de la edad tiende a disminuir el contenido en agua y proteínas y a aumentar la proporción de grasas, en ambos sexos.

La evaluación de la composición corporal del organismo es compleja y se han ideado diversas formas y métodos para estimar y cuantificar diferentes compartimentos y estructuras que conforman el organismo, entre los que cabe destacar:

- Técnicas de dilución con trazadores (inulina, gases solubles en fluidos o grasa corporal, etc.).
- Análisis químicos directos de los componentes (biopsias y cadáveres).
- Técnicas gravimétricas y volumétricas basadas en la diferente densidad de la grasa (0,9 g/cm³), agua (1 g/mL) proteína (1,3 g/mL) o el hueso (4 g/mL).

- Balance metabólico consistente en valorar la retención de nutrientes como proteína, calcio, etc., en función de la ingestión y la eliminación.
- Valoración del K^{40} como índice del número de células, al ser el potasio un ión fundamentalmente intracelular.
- Técnicas de activación de neutrones, que permiten conocer los niveles de diferentes elementos (P, N, etc.) en el organismo.
- Técnicas antropométricas de evaluación de la grasa subcutánea en diferentes regiones del organismo con lipocalibres.
- Técnicas basadas en la conductividad eléctrica en diferentes compartimentos del organismo como la grasa o el tejido magro (tejido sin grasa constituido por proteína y agua mayoritariamente), por bioimpedancia o por la conductividad de ultrasonidos.
- Técnicas de imagen, radiografía, tomografía computerizada y densitometría ósea.
- Cuantificación de la eliminación urinaria de indicadores de la masa muscular como la creatinina o la 3-metilhistidina.

NUTRICIÓN Y BALANCE ENERGÉTICO

El valor energético y la distribución de nutrientes de una dieta afectan al peso y a la composición corporal. La ganancia de peso inducida por excesos en la ingesta de nutrientes energéticos implica aumentos fundamentalmente en el contenido graso, aunque también se acompañan de incrementos en el tejido magro. La pérdida de peso como consecuencia de dietas hipocalóricas se realiza con la contribución de tejido adiposo y

de tejido magro, aunque en general las pérdidas de proteína son proporcionalmente menores en los individuos obesos.

Las recomendaciones dietéticas, más ampliamente aceptadas para el tratamiento de la obesidad, consideran que la restricción calórica (dietas hipocalóricas) es el medio más seguro para alcanzar reducciones en el peso, aunque no son convenientes dietas que aporten menos de 1.000 kcal/día. Estas dietas deben ser elaboradas a partir de hidratos de carbono (50-60% del valor calórico), proteínas (0,8-1,2 kg de peso/día) y lípidos (25-30% de la energía), así como niveles adecuados de minerales y vitaminas. La inclusión de fibra dietética (20-30 g/día) se recomienda en estos regímenes por disminuir la densidad calórica de la dieta, favorecer la sensación de saciedad y promover el tránsito gastrointestinal. Los suplementos de minerales y vitaminas pueden aconsejarse en las dietas de restricción calórica cercanas a 1.000 kcal/d para asegurar un equilibrado aporte de estos nutrientes, ya que con dietas por debajo de este aporte calórico el aporte de minerales y vitaminas puede estar comprometido.

En los regímenes de adelgazamiento, la composición de la dieta y la distribución de nutrientes, incluso con una ingestión calórica equivalente, puede afectar a la cantidad y a las características del peso perdido (Tabla 4-2). En este sentido, una persona que reduce su ingesta energética diaria en 500 kcal/día perderá 1 kg al cabo de 15 días, mientras que las pérdidas en situación de ayuno total, como consecuencia de una cierta adaptación metabólica, no superarán los 2 kg por semana. Así, existen algunas dietas basadas en proteínas líquidas, dietas cetogénicas, dietas bajas en grasas, otras dietas fundamentadas en principios vegeta-

Tabla 4-2. TIPOS DE DIETAS PARA LA PÉRDIDA DE PESO

Dieta	Características	Aplicación	Pérdida de peso esperada
VLCD	< 400 kcal/día	2-4 semanas	1,2-2,0 kg/semana
Hipocalórica	< 1.200 kcal/día	6-12 meses	0,5-1,5 kg/semana
Hiperproteicas	Restringida en energía	4-12 semanas	0,5-1,0 kg/semana
Hipolipídicas (↑CHO)	Restringida en energía	6-10 semanas	0,5-1,0 kg/semana
Hipolipídicas (↑CHO)	<i>Ad libitum</i>	3-6 meses	0,2-0,3 kg/semana
Hiperlipídicas (↓CHO)	<i>Ad libitum</i>	3-6 meses	0,3-0,4 kg/semana

rianos, que influyen de forma muy diferente en la composición del peso perdido.

Las dietas hipocalóricas de baja carga glucémica (40% de la energía), moderadas en proteínas (30% de la energía) y ricas en ácidos grasos monoinsaturados y omega 3, inducen mayor saciedad y resultan sostenibles a largo plazo, a la vez que modifican favorablemente la composición corporal. Este tipo de dietas tienen también efectos positivos sobre los factores de riesgo metabólicos, mejorando la regulación de la insulina, el perfil lipídico y la presión arterial.

Las dietas hipocalóricas preparadas por diferentes laboratorios con fines adelgazantes suelen estar ajustadas calóricamente y proporcionan cantidades apropiadas de todos los nutrientes; sin embargo, a menudo resultan monótonas y difíciles de seguir a largo plazo.

Las dietas cetogénicas bajas en hidratos de carbono y ricas en grasas conllevan una rápida pérdida de peso, acompañada de una elevada producción de cuerpos cetónicos y diuresis, que si bien pueden ser eficaces, deben estar sometidas a supervisión clínica.

En determinadas y raras situaciones pueden emplearse, bajo estricto control facultativo, el ayuno o dieta cero (menos de 200 kcal/día), o dietas de muy baja densidad calórica o VLCD (inferiores a 800 kcal/día) que, aunque consiguen pérdidas de peso notables pueden llevar asociadas alteraciones

hormonales, neurológicas, cardíacas, etc. Entre las dietas de muy baja densidad calórica destacan las ahorradoras de proteína (1,5 g/kg/día), o las dietas de proteína líquida elaboradas con huevos o leche y bajos niveles de lípidos.

Periódicamente, en la prensa popular suelen aparecer diferentes dietas “de moda” o “milagro”, que aseguran pérdidas rápidas de peso sin esfuerzo, entre las que se incluyen diferentes dietas vegetarianas y macrobióticas o dietas basadas en la ingestión de un alimento exclusivo, las cuales, si son seguidas estrictamente pueden acompañarse de serias deficiencias nutritivas, son arriesgadas desde un punto de vista clínico por sus complicaciones, no conllevan pérdida de grasa y no modifican los hábitos alimentarios.

En suma, el método más seguro de conseguir una pérdida de peso basada en principios nutritivos consiste en establecer una adecuación de los hábitos dietéticos, que conlleva una reducción en la ingesta de los nutrientes energéticos de forma racional, con un aporte equilibrado del resto de los nutrientes, más que con dietas drásticas que suponen cambios en las proporciones de proteínas, hidratos de carbono y lípidos. El ajuste del gasto energético, a través de una adecuada actividad física, también puede ser de utilidad en el tratamiento integral de la obesidad por dietoterapia, así como el cambio de las costumbres dietéticas.

Nutrición y recomendaciones dietéticas

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

1. Definir los conceptos relativos a la ingesta de nutrientes, ingesta recomendada de nutrientes y requerimientos dietéticos.
2. Identificar las necesidades nutricionales de individuos.
3. Valorar los factores determinantes para el diseño de dietas equilibradas.

ASPECTOS GENERALES

Una buena alimentación debe basarse en una adecuada ingesta de nutrientes (proteínas, hidratos de carbono, lípidos, minerales, vitaminas y agua) en alimentos variados, con garantías sanitarias, nutritivos y culinariamente satisfactorios, lo cual permite asegurar el funcionamiento de los órganos y sistemas, e incide favorablemente en la salud y calidad de vida del individuo.

Las demandas de nutrientes son específicas para cada persona en función de sus características individuales (herencia genética, condición de trabajo, situación fisiopatológica, clima, etc.), para cubrir los requerimientos de material estructural y energético, así como elementos reguladores. Una adecuada ingesta de nutrientes a través de dietas equilibradas permite ajustar el aporte de nutrientes a las necesidades fisiológicas del organismo.

Una dieta equilibrada, además de promover la salud, puede ser de gran utilidad en períodos de convalecencia y en el tratamiento terapéutico de ciertas patologías a través de dietas específicas. La ingesta desproporcionada de alimentos, tanto por exceso como por defecto, da lugar a situaciones de malnutrición, que pueden ser evaluadas y corregidas a través de la valoración del estado nutritivo.

La interpretación del conjunto de datos de evaluación nutricional constituye el criterio más fiable para el diagnóstico de situaciones de desnutrición y obesidad y para el estudio de las características e influencia del régimen dietético sobre la composición corporal (proteína y grasa fundamentalmente), el metabolismo de los nutrientes y los procesos nutricionales o fisiopatológicos derivados.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN EN LA SALUD



- Detectar posibles situaciones de malnutrición (por exceso o por defecto) de forma temprana, antes de que aparezcan los signos clínicos.
- Confirmar el diagnóstico de malnutriciones específicas.
- Elaborar encuestas de población y caracterizar posibles signos subclínicos de malnutrición.

Los estadios fisiológico-clínicos, que se presentan secuencialmente cuando la ingestión de uno o varios nutrientes es inadecuada, son:

- Adaptación a los niveles de ingesta con modificación de la excreción de nutrientes o sus metabolitos, sin evidencia de signos clínicos de malnutrición.
- Aparición de alteraciones bioquímicas o hematológicas que revelen el deterioro de las funciones celulares o depósito de nutrientes con signos clínicos inespecíficos.
- Manifestación clínica de la alteración nutritiva específica para ese nutriente, o nutrientes.

En la actualidad, los problemas de salud asociados a la nutrición son mucho más frecuentes por desequilibrios en la ingestión proteico-calórica (obesidad y marasmo) que los atribuidos a posibles deficiencias en minerales y vitaminas o enfermedades carenciales (escorbuto, raquitismo, anemias, etc.).

Las investigaciones en dietoterapia y nutrición clínica permiten augurar el desarrollo de nuevas medidas dietéticas en el tratamiento de patologías diversas como la hipertensión (alimentos pobres en sodio), arterioesclerosis, hiperlipidemias y accidentes cardiovasculares (alimentos hipocolesterolémiantes, ácidos grasos poliinsatu-

rados presentes en pescados azules), insuficiencia renal crónica (precursores de aminoácidos), diabetes (hidratos de carbono de liberación lenta), obesidad (dietas hipocalóricas o alimentos *light*), los errores congénitos del metabolismo (alimentos con aminoácidos restringidos o sin gluten), así como en nutrición enteral y parenteral (preparados y fórmulas dietéticas específicas).

RECOMENDACIONES DIETÉTICAS E INGESTAS DE REFERENCIA

Las recomendaciones de nutrientes (RDA o IRN) se definen como los niveles de ingesta de nutrientes considerados esenciales, según el criterio de los comités nacionales e internacionales que los establecen en base a los conocimientos científicos y que cubren, excepto para la energía, las necesidades conocidas de prácticamente todas las personas sanas (97,5%). Los valores de RDA se presentan en diferentes categorías en función de la edad, sexo, situación fisiológica (embarazo, lactancia, etc.), y normalmente son superiores a los verdaderos requerimientos, excepto para las necesidades de energía, por lo que no siempre niveles inferiores deberán ser considerados como inadecuados. Para algunos nutrientes, en lugar de establecer recomendaciones dietéticas se presentan límites de ingestión segura.

La determinación de las necesidades nutricionales y, por tanto, de las recomendaciones dietéticas es muy compleja y se basa en las evidencias científicas que aportan diferentes métodos. En algunas ocasiones se han utilizado, con la debida cautela, la experimentación directa en el ser humano, pero más frecuentemente se han basado en el método repleción y depleción de nutriente, en la estimación de las pérdidas obligadas de éste o en estudios sobre el balance nutricional. En ciertas ocasiones, la evidencia experimental observada en un grupo de edad y sexo o en un modelo animal se ha extrapolado a otros grupos de individuos. Este método se ha utilizado frecuentemente para establecer las recomendaciones en niños.

Las tablas de recomendaciones dietéticas se revisan y completan periódicamente, dado que se basan en interpretaciones de conocimientos científicos susceptibles de modificación. Otros aspectos que también deben tenerse en cuenta al aplicar estas tablas son las posibles variaciones indivi-

duales por componentes genéticos, ambientales o fisiopatológicos de distintas poblaciones, las posibles dificultades de interpretación y cálculo al no presentar siempre valores de aplicación directa y la ausencia de márgenes de seguridad.

El uso de estas tablas de recomendaciones es muy amplio. Así, se utilizan en:

- la planificación de dietas individuales y colectivas,
- el desarrollo de programas de producción de alimentos y de educación nutricional,
- la elaboración y diseño de nuevos alimentos, y
- el etiquetado de productos alimenticios, etcétera.

Las tablas de ingestas de referencia se emplean en la evaluación de la calidad de un alimento a través del cálculo de su densidad nutritiva, definida como el cociente entre el aporte relativo de un nutriente por el alimento respecto a sus recomendaciones y el grado en que las recomendaciones energéticas son cubiertas por este alimento, además de emplearse también en el etiquetado nutricional.

En España, en el año 2010, la Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD) ha iniciado un camino para la implantación de unas ingestas dietéticas de referencia en España, basándose en la experiencia de otros países con una larga tradición en el estudio y desarrollo de recomendaciones de ingesta de nutrientes, así como en los numerosos estudios que se han realizado sobre ingesta de nutrientes en España.

DIETAS EQUILIBRADAS

Las dietas equilibradas son aquellas que cubren las necesidades del individuo para todos y cada uno de los nutrientes y que además mantienen un determinado reparto entre los tres macronutrientes: proteínas, hidratos de carbono y lípidos.

El análisis de los alimentos por técnicas físico-químicas, biológicas y microbiológicas permite conocer su composición y estimar su valor nutritivo, cuya recopilación en las tablas de composición de alimentos correspondientes es de gran utilidad y aplicación en Nutrición y Dietética. Los grupos básicos o rueda de alimentos y las listas



INGESTAS DIETÉTICAS DE REFERENCIA (DRI)

Las DRI se definen como valores de referencia de nutrientes que debe contener una dieta para prevenir las enfermedades deficitarias, reducir las enfermedades crónicas y conseguir una salud óptima, aprovechando el potencial máximo de cada nutriente. Dentro de las DRI se incluyen cuatro conceptos o tipos de valores de referencia con aplicaciones concretas:

- **Requerimiento medio estimado (EAR):** nivel de ingesta diaria de un nutriente que se estima adecuado para cubrir las necesidades de la mitad (50%) de los individuos sanos de un grupo de población en una etapa de la vida y género particular.
- **Aporte dietético recomendado (RDA):** nivel de ingesta media diaria de un nutriente que se considera suficiente para cubrir los requerimientos nutricionales de casi todos (97-98%) los individuos sanos de un grupo de población en una etapa de la vida y género particular.
- **Ingesta adecuada (AI):** nivel de ingesta media diaria recomendada, basada en datos de ingesta media de nutrientes de grupos de individuos sanos, determinados mediante estudios observacionales, estudios experimentales o bien por extrapolación. Dicha estimación se utiliza cuando no hay suficiente evidencia científica para establecer el valor de EAR y calcular la RDA.
- **Nivel de ingesta máxima tolerable (UL):** nivel de ingesta diaria más alto de un nutriente que probablemente no implica riesgo de producir efectos adversos sobre la salud de los individuos de la población general.

de intercambio sirven también como elementos de referencia para la elaboración y confección de dietas.

En la confección de dietas equilibradas, los hidratos de carbono no pueden ser considerados como nutrientes esenciales, ya que pueden obtenerse a partir de precursores presentes en la dieta; sin embargo, se considera conveniente la ingestión de al menos 125 gramos/día, a partir fundamentalmente de cereales y derivados y también legumbres, mientras que la leche, los productos lácteos, las frutas y las verduras representan una menor proporción. Esta cantidad cubre las necesidades

Tabla 5-1. INGESTAS DIETÉTICAS DE REFERENCIA PARA LA POBLACIÓN ESPAÑOLA (FESNAD, 2010)

Edad	Tiamina mg	Ribo- flavina mg	Niacina mg	Ac. Pan- tóico µg	Vit. B ₆ µg	Vit. C mg	Vit. A µg	Vit. D µg	Vit. E mg	Vit. K µg	Ca mg	P mg	K mg	Mg mg	Fe mg	Zn mg	I µg	Se µg	Cu mg	Cr µg	Na mg	Cl mg	F mg	Mn mg	Mo µg
0-4 meses	0,2	0,4	3	1,7	0,2	5	400	8,5	4,0	2,0	400	300	650	40	4,3	3,0	40	10	0,3	0,2	120	180	0,01	0,003	2,0
7-12 meses	0,3	0,4	5	1,8	0,4	6	350	10	5,0	2,5	525	400	700	75	8,0	4,0	80	15	0,3	5,5	370	570	0,5	0,6	3,0
1-3 años	0,5	0,8	8	2,0	0,6	8	400	7,5	6,0	3,0	600	440	800	85	8,0	4,0	80	20	0,4	11	1000	1500	0,7	1,2	17
4-5 años	0,7	0,9	11	3,0	0,9	12	400	5,0	7,0	5,5	700	500	1100	120	8,0	6,0	90	20	0,6	15	1200	1950	1,0	1,5	22
6-9 años	0,8	1,1	12	3,0	1,0	12	450	5,0	7,0	5,5	800	480	2000	170	9,0	6,5	110	25	0,7	15	1200	1950	1,0	1,5	22
Hombres																									
10-13 años	1,0	1,3	15	4,0	1,2	20	600	5,0	11	60	1100	900	3100	280	12	8,0	135	35	1,0	25	1500	2300	2,0	1,9	34
14-19 años	1,2	1,5	15	5,0	1,4	25	800	5,0	15	75	1000	800	3100	350	11	10	150	50	1,0	35	1500	2300	3,0	2,2	43
20-29 años	1,2	1,6	18	5,0	1,5	30	700	5,0	15	120	900	700	3100	350	9,0	9,5	150	55	1,1	35	1500	2300	4,0	2,3	45
30-39 años	1,2	1,6	18	5,0	1,5	30	700	5,0	15	120	900	700	3100	350	9,0	9,5	150	55	1,1	35	1500	2300	4,0	2,3	45
40-49 años	1,2	1,6	18	5,0	1,5	30	700	5,0	15	120	900	700	3100	350	9,0	9,5	150	55	1,1	35	1500	2300	4,0	2,3	45
50-59 años	1,2	1,6	18	5,0	1,5	30	700	5,0	15	120	900	700	3100	350	9,0	9,5	150	55	1,1	35	1300	2000	4,0	2,3	45
60-69 años	1,1	1,6	17	5,0	1,6	30	700	7,5	15	120	1000	700	3100	350	10	10	150	55	1,1	30	1300	2000	4,0	2,3	45
> 70 años	1,1	1,4	16	5,0	1,6	30	700	10	15	120	1000	700	3100	350	10	10	150	55	1,1	30	1200	1800	4,0	2,3	45
Mujeres																									
10-13 años	0,9	1,2	13	4,0	1,1	20	600	5,0	11	60	1100	900	2900	250	15	8,0	130	35	1,0	21	1500	2300	2,0	1,6	34
14-19 años	1,0	1,2	14	5,0	1,3	25	600	5,0	15	75	1000	800	3100	300	15	8,0	150	45	1,0	24	1500	2300	3,0	1,6	43
20-29 años	1,0	1,3	14	5,0	1,2	30	600	5,0	15	90	900	700	3100	300	18	7,0	150	55	1,1	25	1500	2300	3,0	1,8	45
30-39 años	1,0	1,3	14	5,0	1,2	30	600	5,0	15	90	900	700	3100	300	18	7,0	150	55	1,1	25	1500	2300	3,0	1,8	45
40-49 años	1,0	1,3	14	5,0	1,2	30	600	5,0	15	90	900	700	3100	300	18	7,0	150	55	1,1	25	1500	2300	3,0	1,8	45
50-59 años	1,0	1,3	14	5,0	1,2	30	600	5,0	15	90	1000	700	3100	300	15	7,0	150	55	1,1	20	1300	2000	3,0	1,8	45
60-69 años	1,0	1,2	14	5,0	1,2	30	600	7,5	15	90	1000	700	3100	300	10	7,0	150	55	1,1	20	1300	2000	3,0	1,8	45
> 70 años	1,0	1,2	14	5,0	1,2	30	600	10	15	90	1000	700	3100	300	10	7,0	150	55	1,1	20	1200	1800	3,0	1,8	45
Embarazadas	1,2	1,6	15	6,0	1,5	30	700	10	15	90	1000	800	3100	340	25	10	175	55	1,1	30	1500	2300	3,0	2,0	50
Lactancia	1,4	1,7	16	7,0	1,6	35	950	10	19	90	1200	990	3100	340	15	12	200	70	1,4	45	1500	2300	3,0	2,6	50

de los órganos y células glucosa-dependientes y evita la degradación de masa proteica con fines gluconeogénicos. Las recomendaciones dietéticas vigentes estiman que el 50-60% del valor calórico de la dieta sea aportado por los hidratos de carbono, preferentemente en forma de azúcares complejos o polisacáridos (50% de la energía) y el resto refinados (10% de la energía).

La proteína dietética debe ingerirse en cantidad y calidad ajustadas a las necesidades individuales, de manera que aporte las cantidades necesarias de aminoácidos esenciales. La carne, el pescado, los huevos y la leche son fuentes de proteínas (15-22%) de alto valor biológico, mientras que los cereales y las leguminosas aportan también cantidades importantes de proteína (10-30%), aunque de menor calidad, al ser pobres en ciertos aminoácidos como la lisina y la metionina, considerados limitantes. Las recomendaciones dietéticas diarias de proteína en el adulto están establecidas en 0,8-1,0 g/kg de peso y deben suponer entre el 10 y el 30% del valor calórico de la ración diaria.

Los lípidos de la dieta pueden encontrarse de forma visible (aceites, margarinas, etc.) o invisible (leche, huevo, grasa intramuscular, etc.), aconsejándose que el contenido en ácidos grasos sea: saturados (7-10%), monoinsaturados (10-15%) y poliinsaturados (8-10%), respecto del 30-35% del valor calórico que deben aportar estos nutrientes en una dieta equilibrada. El ácido linoleico y también el linolénico son considerados como esenciales y deben encontrarse en cantidades regulares (2-6% de la energía) en la ración diaria.

El valor calórico de la dieta global debe ajustarse a las necesidades individuales para evitar problemas, tanto de obesidad como de desnutrición energética. Las recomendaciones de agua deben ajustarse a las características de la dieta, la actividad desarrollada y las pérdidas por el riñón, el sudor, etc. En un individuo normal las recomendaciones de agua son del orden de 1 mL/kcal. Por último, las recomendaciones dietéticas de minerales y vitaminas, del orden de miligramos o microgramos por día, vienen reflejadas en distintas tablas elaboradas por diferentes organismos nacionales e internacionales en función de la edad, el sexo, situaciones de lactancia, embarazo, etc. (Tabla 5-1).

En síntesis, los objetivos dietéticos de una dieta completa deben considerar la presencia de proteínas (aminoácidos esenciales y no esenciales), las características de los hidratos de carbono (polisacáridos, oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y fibra), la distribución de grasas de origen animal y vegetal (ácidos grasos saturados e insaturados, colesterol), el contenido en sales (macro y microminerales) y vitaminas (hidro y liposolubles), así como el valor calórico y el contenido hídrico aportado por los alimentos y las bebidas. Una dieta saludable puede obtenerse a través de la ingesta de alimentos variados entre los que no deben faltar leche y derivados lácteos, carnes y pescados, legumbres, huevos, frutas y verduras, cereales y pan, así como condimentos.

La deficiencia prolongada de un determinado nutriente conduce a su desaparición progresiva en los tejidos, posteriormente a alteraciones bioquímicas y finalmente a manifestaciones clínicas, características de su defecto en la dieta. Por otra parte, ingestas excesivas de uno o varios nutrientes pueden desarrollar situaciones de obesidad o toxicidad.

LA DIETA EQUILIBRADA



Energía	25-35 kcal/kg de peso/día
Hidratos de carbono	50-60% de la energía total consumida
Complejos	40-50% de la energía total consumida
Simples	10% de la energía total consumida
Fibra	25 gramos/día
Lípidos	30-35% de la energía total consumida
Saturados	< 10% de la energía total consumida
Monoinsaturados	10-15% de la energía total consumida
Poliinsaturados	8-10% de la energía total consumida
Proteínas	10-30% de la energía total consumida 0,8-1,0 g proteína/kg de peso
Agua	1 mL/kcal consumida
Vitaminas	Ingestas de referencia para edad y sexo
Minerales	Ingestas de referencia para edad y sexo

Los hábitos alimentarios de una población dependen de una serie de factores como la disponibilidad de alimentos, las costumbres y tradiciones culinarias y gastronómicas, las modas y campañas publicitarias, así como también los avances en las Ciencias de la Alimentación, que pueden afectar a la conducta del consumidor respecto a su alimentación.

La preparación de dietas por medio de los grupos básicos de alimentos (leche, carne, cereales y

verduras), además de emplear alimentos de diverso origen y naturaleza, asegura el suministro de todos los nutrientes en cantidades apropiadas para distintas necesidades y situaciones fisiológicas, con la excepción del aporte energético, a partir de la ingesta de raciones recomendadas para cada grupo de edad, sexo, actividad física y situación fisiopatológica. En la actualidad, la elaboración de dietas está facilitada enormemente por el empleo de ordenadores y programas destinados al efecto.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

1. Definir las distintas fases de crecimiento de los individuos.
2. Identificar las etapas fisiológicas específicas de un individuo.
3. Valorar los factores que condicionan las necesidades específicas de nutrientes en cada situación fisiológica.
4. Estimar las necesidades de energía y nutrientes en etapas fisiológicas específicas.
5. Identificar los factores nutricionales más apropiados para cubrir las necesidades de nutrientes en cada etapa fisiológica de un individuo.

NUTRICIÓN Y CRECIMIENTO

El crecimiento es un proceso complejo y altamente integrado, que se ha definido como un aumento del número (hiperplasia) o tamaño (hipertrofia) de las unidades metabólicas (células). Este proceso depende de una serie de factores como la herencia genética, la nutrición, el balance neuroendocrino y la situación fisiopatológica, así como de agentes ambientales.

El crecimiento se acompaña de cambios estructurales en la composición y el metabolismo que afectan diferenciadamente a los distintos órganos y tejidos (Fig. 6-1).

Así, el crecimiento celular puede ser debido preferentemente a fenómenos de hiperplasia o aumento del número de células (hígado/riñón), a fenómenos de hipertrofia o de aumento del tamaño celular (nervioso/músculo) o bien a una mezcla de ambos procesos con hiperplasia e hipertrofia (intestino/sangre). Por otra parte, se distinguen diferentes modelos de crecimiento de los órganos en función de las pautas auxológicas posnatales: nervioso, linfoide, genital o general. Las curvas se han trazado utilizando la misma escala en todos los casos, computando los valores a intervalos sucesivos de tiempo, en términos de incrementos de pesos totales (Fig. 6-2).

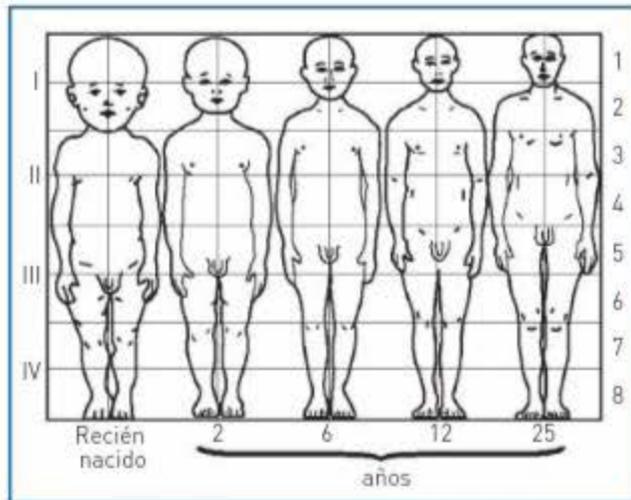


Figura 6-1. Cambio de las proporciones corporales con el crecimiento (Linder, 1992).

Además, el crecimiento se acompaña de cambios en la composición del organismo, afectando a la distribución corporal de proteína, grasa y agua, fundamentalmente.

El crecimiento, desde un punto de vista metabólico, implica un desequilibrio favorable a las reacciones de síntesis (anabolismo) o asimilación, frente a las de degradación (catabolismo) o eliminación, resultando una acumulación de distintos nutrientes (proteínas, lípidos, agua, etc.).

El control del crecimiento depende de la dieta que aporta el material energético y estructural

necesario para la formación de las unidades metabólicas, pero también está sujeto a una regulación neuroendocrina, en la que participan el sistema nervioso vegetativo y el eje hipotálamo-hipofisario, así como diferentes hormonas con efectos anabólicos y catabólicos (GH, hormonas tiroideas, insulina, glucocorticoides, adrenalina, hormonas esteroideas calcitonina, PTH, etc.) y factores de crecimiento (NGF, BMP, PDGF, etc.), que pueden actuar de forma endocrina, paracrina o autocrina.

El término homeorresis se aplica a los mecanismos que dirigen y priorizan el flujo de nutrientes para apoyar el crecimiento y los procesos asociados que afectan a la composición corporal y distribución de nutrientes, mientras que la hormesis hace referencia a las adaptaciones metabólicas frente a un estímulo.

Las técnicas de evaluación del crecimiento incluyen determinaciones destinadas a cuantificar el peso de órganos, el tamaño y el número de células, así como la composición corporal, mientras que los procesos participantes pueden estimarse a través de valoraciones de la dinámica de las reacciones y mediadores implicados. Pueden distinguirse métodos *in vitro* e *in vivo* en función de las características del ensayo y en métodos morfométricos, antropométricos, histológicos, fisicoquímicos, bioquímicos, inmunológicos y cinéticos, según las variables determinadas y técnicas empleadas.

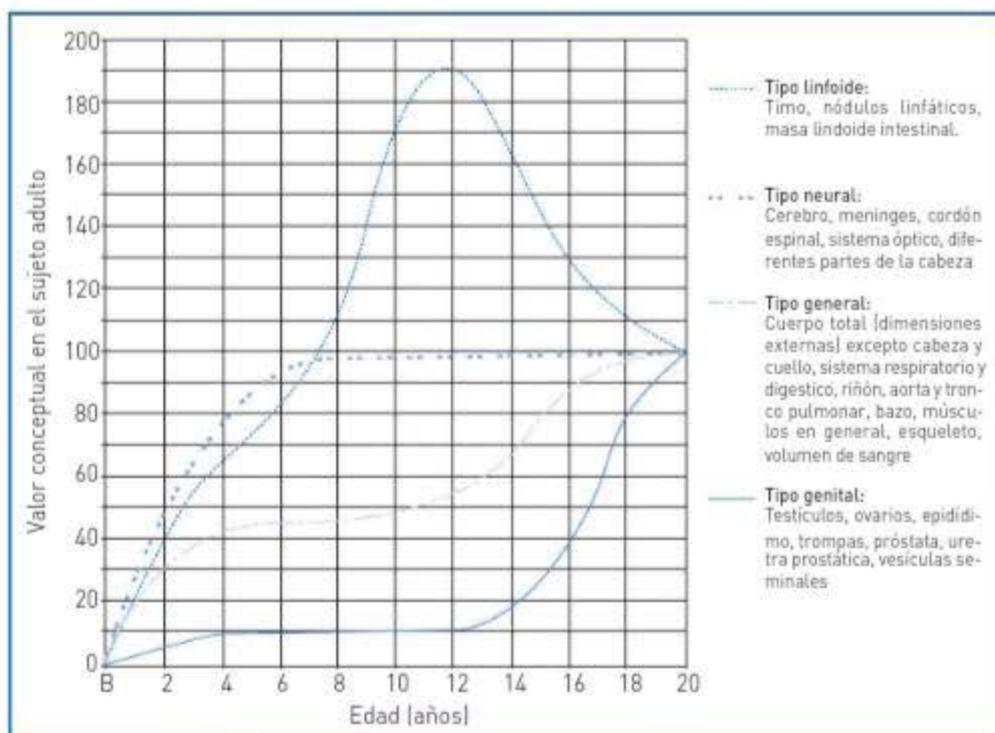


Figura 6-2. Curvas de modelos de crecimiento de los órganos en función de sus pautas auxológicas posnatales.

Las determinaciones encaminadas a evaluar el crecimiento y los mecanismos incluyen: la cuantificación de ácidos nucleicos y proteína en las células, destinada a conocer el tamaño y número de células; el empleo de trazadores radioactivos (Ca^{45} , HPhe^3 , C-Gluc^{14}) para valorar la velocidad de reacciones relacionadas con el metabolismo y depósito de nutrientes y también medidas bioquímicas para conocer el estado de sistemas enzimáticos o los niveles de promotores del crecimiento. Por último, los estudios con cultivos celulares constituyen una alternativa para determinar las tasas de crecimiento en diferentes situaciones metabólicas, nutritivas, etcétera.

El crecimiento puede ser utilizado como índice del estado nutritivo a corto o largo plazo, dependiendo del tipo de medida antropométrica. Las curvas de crecimiento elaboradas en ambos sexos para diferentes parámetros y medidas en función del tiempo vienen expresadas en percentiles y pueden ser indicadores de situaciones de malnutrición crónica (talla) o actual (peso), aunque también existen otros que relacionan el peso con la altura o el perímetro craneal con la altura. El seguimiento de estas curvas patrones depende de factores como el potencial genético, la nutrición y la situación fisiopatológica, de tal forma que cada individuo suele seguir la curva de su percentil de referencia genéticamente predeterminado. Las alteraciones en el crecimiento pueden ser reversibles o irreversibles en función de la etapa y duración del desequilibrio nutritivo.

Las situaciones de malnutrición tanto por exceso como por defecto pueden dar lugar a alteraciones en el crecimiento o auxopatías. Así, la desnutrición proteico-calórica provoca un retraso en el crecimiento permanente que puede ser irreversible, mientras que otro tipo de deficiencias nutritivas de distintos minerales y vitaminas suelen causar una lentificación del crecimiento.

Por otra parte, una excesiva ingesta calórica puede dar lugar a un aumento de los depósitos grasos que se acompaña de situaciones de hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, en función de la etapa y duración del desequilibrio energético.

Por último, diferentes enfermedades como la celiacía, la insuficiencia renal, la anorexia, la malabsorción, los errores congénitos del metabolismo, etc., también afectan a la pauta del crecimiento, así como la radioterapia y ciertos fármacos.

NUTRICIÓN EN EL LACTANTE

Introducción

La nutrición en los primeros estadios de vida es de singular importancia para el normal crecimiento y desarrollo corporal, así como para la prevención y tratamiento de diversas situaciones patológicas. En este sentido, la alimentación del lactante, término que abarca desde el nacimiento hasta los primeros 12 meses de vida, debe considerar un aporte adecuado de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, minerales, vitaminas y agua para cubrir las demandas propias de la formación de nuevos tejidos y el mantenimiento de las funciones basales y el gasto energético.

El aporte de nutrientes en el primer año de vida viene condicionado por el grado de desarrollo morfológico y funcional de algunos órganos y sistemas y por las necesidades específicas de esta etapa, que son críticas para el mantenimiento de un óptimo estado nutritivo presente y futuro.

El lactante, especialmente en los primeros meses de vida, tiene un mayor riesgo nutricional por diversas causas: a) gran velocidad de crecimiento, b) intenso metabolismo, c) falta de desarrollo o de diferenciación tisular, particularmente los sistemas nervioso y digestivo y d) inmadurez de órganos implicados en la regulación del metabolismo endógeno, especialmente hígado y riñón.

Desde el momento del nacimiento, el peso del lactante aumenta rápida pero desaceleradamente, siendo lo normal que el lactante doble su peso en los 4-5 primeros meses y lo triplique al año. La longitud también se dobla en el primer año.

La capacidad respiratoria, la actividad cardíaca y la regulación neuroendocrina, presentan características específicas en el recién nacido. La madurez fisiológica de las funciones renal y del tracto gastrointestinal pueden tardar varios meses en alcanzarse. Así, el ácido gástrico y la producción de pepsina alcanzan los niveles del adulto cuando el lactante tiene unas 6 semanas de edad, mientras que la actividad tripsínica también está reducida aunque resulta adecuada.

La absorción de aminoácidos alcanza el nivel del adulto a los 2-4 meses, aunque hasta los 6 meses existe una mayor permeabilidad a las proteínas y macromoléculas aumentando las posibilidades de sensibilización alérgica. La amilasa salival es normal en el lactante a término, pero la

amilasa pancreática y las disacaridasas no alcanzan niveles de adulto hasta los 6-9 meses, aunque la lactasa aumenta muy rápidamente después del nacimiento inducida por la ingestión de lactosa. La lipasa pancreática así como los niveles de ácidos biliares están disminuidos respecto a los valores del adulto, lo cual puede conducir a una malabsorción de hasta el 35% de las grasas en los lactantes normales.

Por último, la capacidad funcional del riñón no está plenamente desarrollada para excretar sustancias nitrogenadas y sales a lo largo de la lactancia, por lo que la nutrición debe considerar la carga renal de solutos generados.

Recomendaciones dietéticas

Las recomendaciones dietéticas deben considerar las necesidades específicas de cada lactante, que son función de diversos factores como la edad, la velocidad de crecimiento, el metabolismo basal, el clima, las reservas previas, etcétera.

El contenido de nutrientes de la leche materna ha sido utilizado como modelo para elaborar las recomendaciones nutritivas actualmente reconocidas para el lactante y que son las siguientes:

- Energía (E): 90-140 kcal/kg/día.
- Proteínas: 2-2,2 g/kg/día (11-14% E).
- Lípidos: 3,5-6 g/kg/día (30-50% E).
- Hidratos de carbono: 8-12 g/kg/día (40-50% E).
- Agua: 1-1,5 mL/kcal/día.
- Minerales y vitaminas: FESNAD 2010.

La leche materna es un sistema complejo en el que los hidratos de carbono se encuentran en solución, los lípidos en emulsión y las proteínas en suspensión coloidal en una fase acuosa dispersante, donde coexisten moléculas hidrófobas (caseína, colesterol...) e hidrófilas (fosfatos, lactoalbúmina, etc.). La composición de la leche materna difiere, tanto cuantitativamente como cualitativamente de la leche de vaca. Así, el contenido proteico y de sales es más elevado en la leche de vaca, el nivel de lípidos es semejante y la concentración de hidratos de carbono es superior en la leche humana.

Por otra parte, existen diferencias en la distribución del nitrógeno proteico y no proteico y en el contenido en lactoalbúmina, caseína y otras proteínas. El nivel de ácido linoleico y de oligosacáridos es superior en la leche de mujer respecto

a la de vaca, así como el de algunas vitaminas (A, E, C y niacina). La disponibilidad de algunos minerales como el calcio, el hierro y el zinc suele estar aumentada en la leche materna. En determinadas circunstancias, a partir de los 4 meses puede considerarse la posibilidad de administrar suplementos de vitamina D.

Lactancia materna

La lactancia materna, además de suponer un adecuado aporte de nutrientes para cubrir las necesidades durante los primeros 3-12 meses de vida, presenta otra serie de ventajas como:

- reducir el riesgo de sensibilización alérgica,
- brindar protección inmunológica y antibacteriana,
- mejorar la relación maternofilial,
- reducir la mortalidad y morbilidad neonatal,
- evitar contaminaciones exógenas, y
- resultar un método muy económico.

La lactancia materna debe realizarse en una posición cómoda y exige que se lleve a cabo en un ambiente distendido, en condiciones higiénicas del pezón, normalmente con un horario determinado por las demandas del recién nacido con tomas de ambos pechos y con una duración media del orden de 6-9 meses.

En la actualidad, la lactancia materna es el método de elección en la alimentación del lactante; sin embargo, algunas causas de exclusión de la lactancia materna pueden ser debidas a alteraciones anatómicas, funcionales o psicológicas de la madre, hipogalactia, anomalías del lactante en la boca o disfunciones en la succión y deglución, así como por motivos laborales, ansiedad e incluso el tratamiento farmacológico con sustancias que pueden pasar a la leche.

Lactancia artificial

La fórmula infantil consiste en un alimento para lactantes, que es adecuado para sustituir total o parcialmente a la leche humana, satisfaciendo las necesidades nutritivas normales del lactante. Existen dos tipos básicos de fórmulas infantiles: de inicio y continuación, que se aconsejan hasta los 3-4 meses y a partir del cuarto

mes, respectivamente. La composición que han de tener estas fórmulas sigue las pautas establecidas por la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica (ESPGAN), la Asociación Americana de Pediatría (AAP), así como por la Legislación Europea (CEE) y Española (CAE).

Estas fórmulas de inicio adaptadas a partir de leche vacuna se preparan de forma que su composición se asemeje lo más posible a la leche materna dentro de unos márgenes de seguridad y no deben incluir ni almidones, ni acidificantes, ni miel, ni factores de crecimiento, aunque estén presentes pequeñas cantidades de oligosacáridos.

Asimismo, la preparación de leches artificiales, normalmente al 13%, debe producir una osmolaridad inferior a 400 mosmol/L. La elaboración tecnológica de leches de seguimiento exige menos modificación que la leche de vaca dado que los mecanismos homeostáticos del lactante alcanzan niveles de maduración notables a los 4 meses. No obstante, también deben cumplir la reglamentación en cuanto al contenido de nutrientes y técnicas de elaboración. Con objeto de simplificar los criterios de nutrición con fórmulas infantiles se ha sugerido la posibilidad de establecer una fórmula única que puede ser ingerida a lo largo de todo el período de lactancia.

Alimentación complementaria o Beikost

El término Beikost (del alemán "adicional") considera todo alimento ingerido por el lactante distinto de la leche o fórmulas adaptadas, e incluye: cereales, frutas, verduras, carne, pescado y huevos. El momento de la introducción de este tipo de alimentación depende de factores culturales, psicosociales e históricos, aunque normalmente se admite como adecuado a partir del 4.^o-5.^o mes.

Las recomendaciones dietéticas, previas a la implantación de una alimentación Beikost deben considerar que no es conveniente iniciarla antes del 3.^{er} mes ni después del 6.^o mes y que no más del 50% de la energía de la dieta debe obtenerse a partir de alimentos diferentes de la leche.

Los cereales contienen hidratos de carbono, proteínas, minerales (Fe, Ca, Mg), vitaminas (complejo B) y fibra, aportando tanto elementos estructurales y reguladores como energéticos. La presentación suele hacerse en forma de papillas



ALIMENTACIÓN COMPLEMENTARIA (BEIKOST)

Las razones de la inclusión de alimentos complementarios son tanto nutritivas (la leche no es suficiente para cubrir las necesidades de nutrientes del lactante) como somáticas y educativas (coordinación de reflejos de nutrición, deglución e inicio de sensaciones de gusto y olfato) y socioeconómicas. Algunas de las situaciones que aconsejan un control del comienzo de este tipo de alimentos son la posible interferencia con la alimentación al pecho, posible hiperosmolaridad, aparición de alergias o intolerancias, modificación en el apetito e incluso la inclusión de alimentos con componentes indeseables para el lactante (nitratos, aditivos, etc.).

elaboradas a partir de cereales sin gluten (maíz y arroz) y su preparación se realiza con agua o leche (papillas lacteadas). En el mercado existen diferentes formulaciones de harinas para su rápida reconstitución (papillas instantáneas).

Las frutas y verduras aportan al lactante azúcares, fibra, minerales y vitaminas (A e hidrosolubles). La presentación puede hacerse en papillas y purés de confección casera o también homogeneizados comerciales, a los que no deben añadirseles sacarosa.

Las carnes, pescados y huevos son fuentes de proteínas de alta calidad, lípidos, minerales y vitaminas liposolubles e hidrosolubles. La clara del huevo y las vísceras son alimentos de introducción tardía por su potencial alergénico y su contenido en purinas.

Los tarritos (*Baby foods*) son preparados industriales que contienen frutas, verduras, cereales, pescados, carnes, etc., que se deben elaborar siguiendo unas normas estrictas de control de calidad y con un adecuado valor nutritivo, cuyos ingredientes, composición (proteína, sodio y densidad energética) y manipulación deben figurar en la etiqueta.

Las características de las fórmulas de inicio, de continuación y los tarritos comerciales vienen regulados por una serie de normas establecidas por los organismos e instituciones anteriormente citados, que afectan tanto al valor nutritivo (contenido máximo y mínimo de nutrientes), a la ausencia de determinadas sustancias o contaminantes, y al etiquetado, conservación, forma de preparación y fecha de caducidad.

El tipo y orden en la introducción de los alimentos adicionales es variable, aunque se aconseja comenzar por cereales sin gluten, frutas y verduras, continuar posteriormente con pescados, carnes y finalmente huevos, vísceras y productos elaborados. El cualquier caso el entorno socio-cultural y la historia familiar de riesgo alergénico condicionan el protocolo Beikost.

Pautas dietéticas

El modelo de nutrición del lactante se basa en una introducción gradual y progresiva de los alimentos (Fig. 6-3). Así, la lactancia materna o artificial (fórmulas adaptadas) en los primeros días debe realizarse en 6-7 tomas de entre 20 y 70 mL/toma y debe constituir el alimento único hasta los 3-4 meses, cuando se aconseja 5-6 tomas de 140-160 mL/toma.

A partir del 4.º-6.º mes se empiezan a introducir una toma de cereales sin gluten, una toma de papillas de frutas sin sacarosa y 3-4 tomas de leche materna o fórmula infantil del orden de 180-200 mL/toma. La ingesta de carne y pescado suele comenzar a partir del 6.º-9.º mes en pequeñas cantidades (25-50 g), sustituyendo a alguna de las tomas de leche de 180-250 mL. La yema del huevo cocido puede introducirse a partir del 9.º mes y a partir del año el huevo completo, las vísceras y quesos curados. En cualquier caso, se recomienda que desde los 6 meses se imponga un mínimo de 500 mL de leche, que ya puede ser de vaca o fórmula infantil.

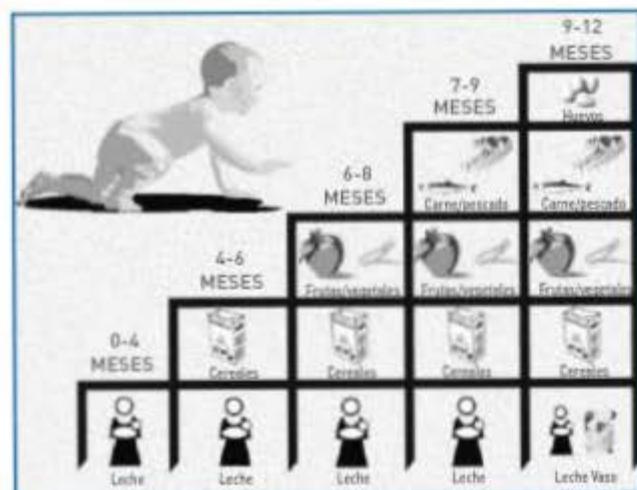


Figura 6-3. Introducción a los alimentos sólidos en el lactante.

NUTRICIÓN DURANTE LA GESTACIÓN

Introducción

Durante la gestación las necesidades de alimentos, por parte de la futura madre, están incrementadas respecto a los de la mujer no embarazada. El popular dicho de que “una mujer gestante debe comer por dos” no es correcto desde el punto de vista cuantitativo; sin embargo, denota el incremento de las exigencias nutritivas por parte materna. En este contexto, la influencia de la nutrición durante el período prenatal se ha puesto de manifiesto, de forma trágica pero evidente, como consecuencia de las restricciones alimentarias sufridas por mujeres embarazadas en Holanda y en Leningrado a lo largo de la Segunda Guerra Mundial, donde esta situación de carestía provocó un descenso en el peso de los recién nacidos y un aumento del número de abortos y nacimientos prematuros, que además implicaban una serie de trastornos metabólicos en el adulto.

Inmediatamente después de la concepción, el organismo materno inicia una serie de procesos de adaptación para proporcionar al feto un entorno adecuado, que asegure su ciclo vital. Así, todos los cambios fisiológicos, bioquímicos y metabólicos, que se presentan en los diferentes órganos y sistemas de la madre, van encaminados al desarrollo, la nutrición y el mantenimiento de los procesos vitales de su futuro hijo, en el período de mayor crecimiento de toda su vida. Para cubrir las necesidades adicionales de la madre y del feto debe aumentarse de modo proporcional el aporte de nutrientes.

Algunos autores han señalado que el estado nutritivo de la mujer, previo a la concepción, puede ser incluso de tanta importancia como la dieta ingerida durante el embarazo. También factores genéticos, biológicos, sociales y psicológicos pueden afectar al curso del embarazo. En cualquier caso, el papel de la nutrición y la valoración del estado nutritivo en el período reproductivo debe considerarse bajo la óptica de una situación normal y necesaria desde un punto de vista fisiológico y no como un proceso patológico.

Necesidades de nutrientes durante el embarazo

El embarazo ha sido definido como “el establecimiento de un sistema integrado materno-

fetal, sometido a cambios fisiológicos progresivos, con objeto de salvaguardar y permitir el desarrollo del producto de la concepción, así como a satisfacer las necesidades de cada momento de su ciclo vital”.

A lo largo del embarazo y, particularmente, durante los últimos meses, la mujer gestante incrementa sus necesidades energéticas, de proteínas y de la mayor parte de los minerales y de vitaminas. Durante el período prenatal, la futura madre debe contribuir al crecimiento del feto y la formación de nuevos tejidos, aportar nutrientes para las nuevas demandas metabólicas y al mismo tiempo mantener sus propias funciones fisiológicas. Un error que puede cometerse en la alimentación de la gestante es pensar que el incremento en las necesidades se produce sólo en el tercer trimestre. Las razones que justifican el incremento de las necesidades a lo largo de todo el embarazo son que durante el primer trimestre de gestación se producen los fenómenos de más intensa diferenciación celular, ya que es en esta época cuando se establece la organogénesis embrionaria, y porque durante este primer trimestre la madre almacena o aumenta la concentración de diversos nutrientes en diversas estructuras como el hígado, músculo huesos y placenta.

Los suplementos pueden variar según el peso, la edad, la actividad y la situación fisiopatológica,

por lo que deben considerarse a título indicativo y no para elaboración de dietas individuales.

Energía

La futura madre necesita energía adicional para apoyar el crecimiento del feto y la placenta, para permitir acrecentar sus reservas de grasa y para compensar el mayor consumo calórico del metabolismo basal, y del trabajo que supone llevar el feto.

El incremento total de las necesidades energéticas en el período de los 9 meses del embarazo se estima en 80.000 kcal, que corresponden a la adición de 300 kcal/día a las ingestas recomendadas de energía. Por otra parte, debe recordarse que se necesita un aporte de 36 kcal/kg para una utilización satisfactoria de la proteína. La mujer desnutrida y las adolescentes habrán de ganar más peso en el embarazo, por lo que sus requerimientos energéticos pueden ser todavía un poco más altos.

El incremento de las raciones calóricas en la gestación es relativamente pequeño, comparado con los aumentos de las necesidades de proteínas, vitaminas y minerales. Tan importante es que la embarazada no aumente en exceso su peso, como que el incremento no sea muy pequeño. No deben ingerirse grandes cantidades de comida, sino que hay que equilibrar adecuadamente su contenido y su calidad.

Proteína

Los aminoácidos de la proteína son necesarios para la síntesis de los nuevos tejidos de la madre y del feto, por tanto debe conservarse un balance positivo de nitrógeno durante todo el embarazo. Con objeto de cubrir el aumento de las necesidades de proteína se recomiendan 15 g/día adicionales de proteínas a los usuales 0,8 g/kg/día de las mujeres no embarazadas. Estos valores, ajustados por edades, se transforman en 1,3 g/kg/día para mujeres de más de 19 años y 1,5 g/kg/día para madres gestantes menores de 19 años. Por otra parte, un ingreso de calorías adecuado, a partir de hidratos de carbono y lípidos, es indispensable para facilitar una utilización eficiente de las proteínas.

La distribución de las proteínas ingeridas debiera ser de dos tercios de origen animal (hue-

RECOMENDACIONES NUTRICIONALES EN EL EMBARAZO



Energía	300 kcal adicionales/día
Proteínas	mayores de 19 años: 1,3 g/kg/día menores de 19 años: 1,5 g/kg/día
Minerales	Necesidades incrementadas
Calcio	1.200 mg/día
Fósforo	1.200 mg/día
Hierro	Suplementación de 30-60 mg/día
Yodo	175 µg/día
Vitaminas	Necesidades aumentadas
Ácido fólico	400 µg/día
Niacina	↑ 15% respecto a IR en mujeres
Riboflavina	↑ 25% respecto a IR en mujeres
Tiamina	↑ 40% respecto a IR en mujeres
Piridoxina	2,5 mg/día
Cobalamina	↑ 33% respecto a IR en mujeres
Vitamina C	80 mg/día
Vitamina A	1.000 µg RE/día
Vitamina D	10 µg/día
Vitamina E	↑ 25% respecto a IR en mujeres

vos, carne, pescado y leche) y el resto de origen vegetal, para satisfacer la demanda de aminoácidos esenciales. En general, si se cubren las necesidades de proteína, el aporte del resto de los nutrientes excepto la vitamina C, la vitamina A y la vitamina D, es satisfactorio.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la ingesta de insuficientes cantidades de proteínas, dan lugar a procesos edematosos en la madre, así como el alumbramiento de hijos de menor peso y tamaño.

Minerales

Las necesidades de minerales son más elevadas en el caso de las embarazadas. Así, el calcio y el fósforo se requieren para la mineralización de los huesos del feto; de tal forma que al cabo del embarazo, 30 g de calcio y 16 g de fósforo se han acumulado en ellos. Esta demanda es cubierta, en parte, por una mayor absorción y una menor excreción de calcio. La ingesta recomendada para el calcio y fósforo se estima en 1.200 mg/día para cada uno de ellos.

Para que exista una adecuada utilización de calcio y fósforo para la calcificación de huesos, debe suministrarse a menudo también un suplemento de vitamina D. En el caso de que el aporte de calcio en la dieta sea insuficiente, la mujer grávida deberá ceder calcio de sus propios huesos en beneficio del feto, con lo cual la vieja historia de “un diente por cada hijo” puede adquirir visos de realidad.

Los requerimientos de hierro crecen durante la gestación, porque ese mineral es imprescindible para sintetizar varios compuestos, entre ellos la hemoglobina de los eritrocitos. Además, el hierro se almacena en el hígado del feto, como reserva para su utilización en los primeros seis meses de vida.

Debido a que una dieta normal contiene aproximadamente sólo 6 mg por 1.000 kcal y también a que la mayoría de las mujeres en el momento de la concepción tienen bajas reservas de hierro, se aconseja la suplementación con 30-60 mg de hierro en forma de sal ferrosa en los dos últimos trimestres de gravidez, a pesar de que la absorción de hierro puede duplicarse o triplicarse durante este período.

La elevación del volumen de líquido extracelular y sanguíneo hace aumentar las necesidades de agua y sodio. En el embarazo, el aumento de la fil-

tración glomerular es compensado por un incremento de la reabsorción tubular de sodio, evitándose por tanto una posible situación de hipovolemia por excesiva eliminación de sodio. La restricción de sodio fue utilizada antaño para combatir el edema y la hipertensión; sin embargo, actualmente se recomienda seguir una alimentación con una ingesta suficiente en sal y evitar los diuréticos.

El yodo es otro mineral importante en el período prenatal para cubrir las crecientes necesidades de la glándula tiroides materna y del feto y también para reponer el exceso de yodo excretado en la orina. Las situaciones de deficiencia en yodo producen bocio materno y en casos de carencia severa dan lugar a cretinismo en los hijos. Las recomendaciones actuales de yodo en la dieta de la mujer grávida están establecidas en 175 µg/día. Se recomienda el empleo de sal yodada, particularmente en aquellas zonas en las que el suelo y el agua son deficientes en dicho elemento.

Las necesidades del resto de los minerales crece durante el embarazo. Por ejemplo, estudios con ratas señalan que las dietas pobres en zinc aumentan la incidencia de defectos congénitos en las crías. En cualquier caso, son necesarios muchos trabajos para fijar las necesidades específicas de zinc y de otros oligoelementos en esta etapa de la vida.

Vitaminas

Las ingestas recomendadas de vitaminas también aumentan en el embarazo. En general, las necesidades de las vitaminas del grupo B son satisfechas si se cubren las recomendaciones de energía, proteínas y calcio. Las vitaminas hidrosolubles reunidas dentro del complejo B: tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B₆, vitamina B₁₂, ácido pantoténico, biotina y ácido fólico o folicina –además de tener funciones semejantes relacionadas con el metabolismo intermediario– presentan estrechas interrelaciones entre sí, de tal forma que el exceso de una de ellas puede afectar las necesidades de otras.

De las vitaminas B, el ácido fólico incrementa sus requerimientos de forma drástica durante la gestación, pasando de 150 a 400 mg/día, ya que participa en la división celular y en la síntesis de ADN. Los niveles de ácido fólico en una dieta normal no suelen alcanzar los valores recomendados, por lo que suele ser necesaria su suple-

mentación para evitar situaciones de anemia megaloblástica, frecuentes en las deficiencias de esta vitamina.

La niacina (ácido nicotínico o factor PP), riboflavina y tiamina aumentan sus necesidades en un 15, 25 y 40% respectivamente, para llevar a cabo sus funciones como cofactores y coenzimas en diferentes rutas metabólicas durante el embarazo. De igual forma, la vitamina B₆ o piridoxina, que participa en el metabolismo aminoacídico y en la conversión de triptófano en niacina, aumenta sus requerimientos de 2 a 2,5 mg/día. La vitamina B₁₂ o cobalamina, implicada en la producción de glóbulos rojos y también en la fisiología del sistema nervioso, incrementa sus requerimientos en un 33% para asegurar niveles adecuados en la madre y en el feto. También la vitamina C o ácido ascórbico, necesaria para la constitución del tejido conectivo y el sistema vascular, eleva sus requerimientos hasta 80 mg/día.

Las ingestas recomendadas de las vitaminas liposolubles A, D y E se incrementan durante la gestación. La vitamina A interviene en el normal desarrollo celular, en la fotorrecepción y en la osteogénesis, por lo que se sugiere incrementar desde 800 a 1.000 mg RE/día el contenido de esta vitamina en la dieta. Las deficiencias maternas de vitamina A dan lugar a alteraciones en la visión del recién nacido.

La asimilación de calcio y fósforo depende de la presencia en la dieta de cierta cantidad de vitamina D. Actualmente se está generalizando la suplementación de vitamina D a la leche entera o descremada (400 UI o 10 mg de colecalciferol/litro). Las necesidades de esta vitamina se incrementan aproximadamente en 5 mg/día, aunque los requerimientos en adolescentes gestantes pueden ser mayores.

El papel de la vitamina E en el embarazo no ha sido todavía bien establecido. El incremento del 25% sugerido en las recomendaciones se basa en sus propiedades antioxidantes para el ácido ascórbico, la vitamina A y los ácidos grasos poliinsaturados.

Aunque las necesidades de vitamina A, D y C se elevan durante la gestación, debe procurarse no introducir un exceso de las mismas en la dieta. Así, se sabe que las vitaminas A y D a dosis altas son teratogénicas, y que el consumo de demasiada vitamina C puede incrementar la necesidad fetal de ella y ocasionar escorbuto en el niño después del parto.

Recomendaciones dietéticas durante el embarazo

Los incrementos en los requerimientos nutritivos durante el embarazo se han revisado en el apartado precedente. Sin embargo, para que tengan un verdadero contenido práctico es conveniente presentarlos en términos dietéticos.



Inicialmente, se deben tener en cuenta dos criterios para establecer las recomendaciones dietéticas durante la gestación:

- El **estado nutritivo de la madre** en el momento de la concepción es tan importante como la dieta que se observe en la gestación. Ocasionalmente, pueden requerirse terapias dietéticas específicas en casos de malnutrición o alteraciones patológicas maternas.
- El **aumento de las necesidades** de proteínas, vitaminas y minerales es proporcionalmente mayor que el de las necesidades calóricas, por lo cual deben seleccionarse alimentos en función de la calidad más que de la cantidad.

En el primer trimestre del embarazo, la mujer gestante debe asegurarse de que está ingiriendo una dieta equilibrada en todos los nutrientes, mientras que durante el segundo y tercer trimestres se van a requerir modificaciones adicionales para satisfacer las crecientes demandas de energía, proteína, minerales, etcétera.

En principio, para cubrir los requerimientos de nutrientes durante el embarazo, se debe seguir el Plan de los cuatro grupos de alimentos básicos, con algunos cambios y suplementos.

Grupo de la leche y productos lácteos

El consumo de leche debe ajustarse a cuatro o más tomas de 240 mL diarias. Un litro de leche proporciona 30 g de proteína de alta calidad, 1.250 g de calcio y entre 320 kcal, si la leche es desnatada, y 640 kcal, en el caso de ser completa. Alguna ración de leche puede sustituirse por 60 g de queso o 125 g de yogur. Estos productos además de proteínas, calcio y energía también suministran riboflavina, vitamina B₁₂ y vitamina A. Algunos derivados lácteos pueden encontrarse fortificados con vitamina D.

Grupo de las carnes

Dos o más porciones de 125-200 g deben obtenerse de este grupo, en el que se incluyen legumbres, frutos secos, huevos, pescados y mariscos, así como carne de vacuno, porcino, ovino y volatería. Este grupo es fuente de proteínas de alta calidad, de vitaminas del complejo B y zinc. Las carnes rojas y el hígado proporcionan el hierro, que resulta imprescindible. Si se recurre a sustitutivos de la carne, entre ellos leguminosas y frutos secos, conviene suplementar sus proteínas con otras complementarias respecto a sus aminoácidos esenciales limitantes.

Grupo de las frutas y verduras

Diariamente deben ingerirse por lo menos cuatro porciones de entre 100 y 200 g de este grupo. Las verduras de hoja verde han de constituir una de las porciones, al ser fuente de ácido fólico, vitamina C, vitamina A, vitamina E y vitamina K. Otra porción se obtendrá de productos ricos en vitamina C: cítricos, pimientos verdes, tomates, etc. Las frutas y verduras de color naranja y amarillo suelen contener abundante vitamina A en forma de carotenos.

Grupo de los cereales

La mujer embarazada debe incluir en su dieta cuatro raciones diarias del grupo de panes y cereales, con preferencia entre los productos de grano entero. Con cuatro rebanadas de pan de 20-30 g aproximadamente se cubre este aspecto. Los cereales obtenidos de la pasta italiana o del arroz pueden sustituir una parte de pan. Los cereales se combinan con las leguminosas para suministrar proteínas de calidad equilibrada y proporcionan además hierro y vitaminas del grupo B. Los cereales integrales son una fuente importante de fibra, lo cual ayuda a prevenir el estreñimiento durante la gestación.

El seguimiento de la pauta propuesta no cubre todas las exigencias energéticas de la embarazada. Para atender el resto de las necesidades calóricas de las mujeres gestantes, hay que recurrir a productos de alta calidad comprendidos dentro de cada grupo de alimentos y otros no incluidos en los grupos anteriores, como margarina, dulces, salsas, etcétera.

El consumo de sal debe mantenerse normal, siendo aconsejable la utilización de sal yodada, sobre todo en zonas endémicas, para asegurar un aporte adecuado de este elemento. En cuanto a la bebida, es recomendable la ingestión diaria de 6 a 8 vasos de agua (1-2 litros), con niveles adecuados de flúor.

Quizá con la excepción del hierro y el ácido fólico, todos los nutrientes restantes son aportados adecuadamente por el plan descrito, para asegurar un estado saludable de la madre y del feto. Los suplementos de hierro, como sulfato ferroso, para satisfacer las necesidades de este mineral, así como el aporte de ácido fólico, suelen aconsejarse por tanto durante este período.

Otros suplementos de minerales y vitaminas deben realizarse bajo supervisión facultativa, ya que puede existir riesgo de toxicidad, en particular en las vitaminas A y D y de dependencia para la vitamina C en el lactante.

Conclusiones

Las investigaciones con animales de experimentación, las encuestas dietéticas a mujeres gestantes y las observaciones de los efectos de distintas situaciones de malnutrición durante el embarazo demuestran que el estado nutritivo de la madre antes y durante la gestación participan de modo importante en su salud y en la del feto, así como en el desarrollo del embarazo.

En el curso del embarazo se producen cambios en la fisiología y el metabolismo maternos, asimismo el período intrauterino representa la época de mayor crecimiento y desarrollo del ciclo vital humano. Ambas situaciones implican una gran demanda energética y de nutrientes. Durante el segundo y tercer trimestre de la gestación las necesidades de alimentos aumentan en relación a los de la mujer normal no embarazada. Para cubrir estos requerimientos adicionales de la madre y el feto, debe incrementarse de forma proporcional el aporte de los nutrientes esenciales.

NUTRICIÓN EN EL ANCIANO

Introducción

La salud de las personas de edad avanzada depende, entre otros factores, de su nutrición durante la infancia, la adolescencia y la madurez.

El hecho de no existir un hito biológico que delimite la ancianidad convierte a este colectivo de la sociedad –denominado genéricamente tercera edad– en un grupo muy heterogéneo y con grandes diferencias interindividuales. Esto ha llevado a distintos autores a señalar el inicio de la tercera edad entre los 60 y 80 años. Por razones sociales, el momento de la jubilación –en torno a los 65 años– suele ser considerado como punto de referencia. Según una encuesta reciente existen en nuestro país más de 4.500.000 de personas mayores de 65 años, lo que representa aproximadamente el 12% de la población española.

La pérdida progresiva de células y el deterioro de los procesos celulares propios del envejecimiento llevan asociadas alteraciones en diferentes funciones orgánicas. Este panorama está ensombrecido por situaciones patológicas y psicosociales adversas, frecuentes en las personas de edad avanzada.

A partir de estimaciones longitudinales, es decir, por estudio de las mismas personas en períodos prefijados de tiempo, se ha recogido valiosa información acerca de la evolución de las diferentes variables con la edad, como la composición corporal, diversas funciones fisiológicas, procesos metabólicos, etcétera.

Los cambios en la composición corporal con el paso de los años se manifiestan con una disminución del contenido proteico compensado parcialmente por una mayor acumulación de grasa, que incluso puede dar lugar a incrementos de peso globales. También en las personas de edad existe una reducción en el agua intracelular y la densidad ósea, mientras que el agua extracelular permanece relativamente constante. Los procesos de envejecimiento modifican igualmente la composición y peso de los distintos órganos y tejidos en diferente proporción, siendo el tejido muscular y el hueso las estructuras más afectadas, con pérdidas de hasta el 40 y 25% de su peso, respectivamente.

En esta línea, en la senectud suele existir una pérdida de la actividad y de la capacidad de múltiples funciones fisiológicas. Así, existe una reducción en la velocidad de conducción de impulsos nerviosos, de la capacidad respiratoria, del gasto cardíaco, de la filtración glomerular y de la potencia muscular. También el tracto gastrointestinal disminuye su motilidad y su capacidad secretora con trastornos en los procesos

de digestión y posiblemente de absorción. Además, las alteraciones sensoriales, en el gusto y olfato principalmente, con reducción de la sensibilidad y número de receptores, pueden acentuar el desinterés por los alimentos en estas personas.

Las reacciones que integran el metabolismo también se modifican de forma progresiva en este segmento de la población. En general, existe una disminución del consumo de O_2 y del metabolismo basal, acompañados por una menor tolerancia a la glucosa. La capacidad del organismo para sintetizar, degradar y excretar lípidos está reducida, por lo que en consecuencia tiende a existir una acumulación de estos productos en la sangre y los tejidos. Adicionalmente, los procesos de envejecimiento llevan asociada una disminución de las reacciones de síntesis y degradación de la proteína corporal, es decir se reduce tanto el anabolismo como el catabolismo proteico.

Otros cambios propios del envejecimiento son las alteraciones de los valores de diferentes variables bioquímicas. El volumen y pH sanguíneos, la presión osmótica, el recuento y la fórmula leucocitaria permanecen relativamente estables con el paso de los años; sin embargo, los valores de colesterol, triglicéridos, fosfatasa alcalina, urea y ácido úrico tienden a aumentar, mientras que otros como la albúmina plasmática y el hierro plasmático tienden a disminuir en los ancianos.

Otros aspectos entre los que figuran la pérdida de piezas dentarias, la apatía y deterioro mental, la pérdida de la fuerza y coordinación muscular y disfunciones gastrointestinales y sensoriales, también son importantes a la hora de considerar el estado general del anciano.

El aislamiento y la soledad, la reducción de los ingresos económicos, la aparición de enfermedades crónicas, la falta de cultura y de amistades pueden afectar también, de forma directa o indirecta, al propio proceso de envejecimiento.

Nutrición y longevidad

La posibilidad de aumentar la esperanza de vida del ser humano y de retrasar los síntomas de envejecimiento han constituido uno de los campos de investigación más atrayentes para los alquimistas y científicos de todos los tiempos.

Entre los factores que afectan en los procesos de longevidad se han citado la herencia genética, las influencias ambientales, los procesos patológicos, el espacio físico y la nutrición.

En este contexto, algunos estudios llevados a cabo en humanos han proporcionado cierta evidencia de la influencia de la nutrición sobre la velocidad del envejecimiento. Sin embargo, la mayoría de los trabajos y estudios sobre la participación de la nutrición, como agente modulador del envejecimiento, han sido realizados en modelos animales, dadas las dificultades tanto prácticas como éticas, para su aplicación en el hombre. En cualquier caso, se estima que son necesarias nuevas investigaciones en este campo.

Uno de los métodos más ampliamente utilizados para prolongar la vida de los animales de experimentación es la restricción calórica de la dieta. Con esta técnica se alarga el período de vida en los roedores al equivalente a una esperanza de vida en el hombre de 180 años. Obviamente, este tratamiento dietético es difícil de aplicar en humanos, ya que provocaría retraso en el crecimiento y carencias nutricionales.

Otros estudios han puesto de manifiesto que elevadas cantidades de grasa en la dieta aceleran los procesos de envejecimiento, mientras que el contenido de proteína e hidratos de carbono, aparentemente afectan poco a la longevidad, si no están asociados a una disminución de la ingesta calórica. Algunos investigadores, alimentando animales con dieta de diferente calidad proteica, han indicado que al aumentar ésta se pueden mejorar cualitativa y cuantitativamente la esperanza de vida.

Los trabajos más recientes en este campo sugieren que algunos **antioxidantes fisiológicos** pueden ser útiles para aumentar la longevidad y detener el ritmo del envejecimiento de los ratones. Entre las sustancias empleadas con esta finalidad están la vitamina C, la vitamina E, la vitamina D y el glutatión, que neutralizarían algunas de las reacciones propias del envejecimiento. También al selenio le ha sido asignado últimamente un papel como antioxidante, aunque no existen datos firmes en humanos.

En cualquier caso, la posibilidad de influir por medios dietéticos en la velocidad del envejecimiento debe ser observado siempre con cautela por el profesional sanitario.

Necesidades nutritivas y recomendaciones dietéticas en la tercera edad

En el caso de los ancianos existen dificultades de diversa índole para establecer las recomendaciones dietéticas, ya que se trata de un grupo muy heterogéneo debido a la distinta variabilidad de agresiones y experiencias de vida que el hombre sufre desde que nace. Por otra parte, los estudios nutricionales geriátricos son más escasos que en otras etapas vitales. Además, la incidencia de manifestaciones patológicas es muy elevada. Una consideración importante en el establecimiento de las recomendaciones para la tercera edad es el aumento de las interacciones entre fármacos y nutrientes y entre fármacos y el estado nutricional debido a la elevada prescripción de medicamentos, como consecuencia de la mayor incidencia de patologías. Hay que señalar también que existe un cierto desconocimiento de la naturaleza íntima de los procesos de envejecimiento, lo cual supone otro elemento de dificultad. Finalmente, hay que señalar que las recomendaciones dietéticas elaboradas por los comités de expertos en el caso de la tercera edad es que se fundamentan en personas sanas, sin prestar especial atención a las variaciones propias del anciano (envejecimiento, patología, etc.).

En general, en las demandas y problemas nutritivos de la persona de edad avanzada, están involucrados alguno o varios de los siguientes aspectos:

- Cambios fisiológicos asociados al envejecimiento.
- Situación socioeconómica.
- Procesos patológicos y terapéuticos.
- Consumo inadecuado de alimentos.
- Desinformación.

Energía

Las necesidades calóricas varían con la edad, sexo, complexión, actividad, etc. En general, existe una disminución de las necesidades energéticas del anciano. Esta situación se explica fundamentalmente por la disminución de su metabolismo basal como consecuencia de los cambios experimentados en su composición corporal (disminución de masa muscular y aumento de masa grasa) y por la menor actividad desplegada por las personas de edad avanzada.

Proteínas

La masa corporal proteica disminuye de forma progresiva a partir de los 20-30 años. El aporte de proteínas en el anciano está sujeto a cierta controversia, ya que existen diferentes estudios con resultados discordantes respecto a las necesidades nitrogenadas. Sin embargo, las recomendaciones más utilizadas sugieren una ingesta proteica de 0,8 y 1,0 g/kg, que debe representar alrededor del 12-14% de la ingesta energética. También se ha sugerido que las necesidades de distintos aminoácidos pueden estar alteradas en el anciano, como por ejemplo la metionina, el triptófano, la treonina y la lisina. En cualquier caso, está indicada la ingestión de proteínas de alto valor biológico y de fácil digestión. El exceso de proteínas de la dieta puede producir una sobrecarga a la función renal.

Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono de la dieta son empleados fundamentalmente para la obtención de energía por combustión. No han sido delimitadas las necesidades mínimas de hidratos de carbono en el anciano y el control de su ingestión se basa en la detección de procesos de intolerancia a la glucosa y lactosa y en posibles situaciones de obesidad. En los países mediterráneos el aporte calórico de una dieta suele derivar entre un 40-50% de los hidratos de carbono.

Lípidos

La cantidad de grasa incluida en las dietas destinadas a personas de tercera edad puede estar den-

tro de los objetivos nutricionales de los adultos jóvenes, es decir entre el 30 y el 35% de la energía total. En esta etapa, quizá más importante que la cantidad es la calidad de la grasa. Por otra parte, en esta etapa de la vida parece que se produce una cierta disminución de la actividad de las desaturasas, con la consiguiente disminución de la disponibilidad de ácidos grasos de la serie n-3. Por ello, es importante que el pescado y en concreto el pescado azul esté presente en la dieta de los ancianos.

La ingesta de colesterol en el anciano puede ser algo más libre que en el adulto. No es necesario ser excesivamente estricto en intentar retrasar el desarrollo de aterosclerosis cuando se superan los 75 años, ya que cualquier daño arterial ya ha sido producido. En cualquier caso conviene situar la ingesta de colesterol en torno a los 300 mg/día.

Minerales

De todos los minerales el calcio y el hierro son objeto de mayor preocupación para el sanitario, dado que no son infrecuentes las deficiencias de estos minerales en el anciano. Así, niveles inadecuados de calcio en la dieta previa originan situaciones de osteoporosis y osteomalacia, preferentemente en mujeres a partir de la menopausia mientras que la baja ingestión de hierro puede producir procesos anémicos ocasionalmente. También el zinc y el yodo pueden encontrarse en niveles por debajo de las recomendaciones.

Vitaminas

Los datos recopilados por diferentes investigadores indican que, en la edad avanzada, las vitami-

RECOMENDACIONES NUTRICIONALES EN EL ANCIANO

Energía	Disminuyen necesidades energéticas
Hidratos de carbono	40-50% de la energía total consumida
Proteínas	0,8-1,0 g/kg/día
Lípidos	30-35% de la energía total consumida
Minerales	Se debe prestar atención para mantener ingestas adecuadas de calcio y hierro
Vitaminas	Necesidades aumentadas de vitamina A, vitaminas del complejo B, ácido fólico, C, D y E. Se recomiendan suplementos polivitamínicos
Fibra	20-30 g/día
Fluidos	1.000-3.000 mLde agua/día



nas con mayor riesgo de deficiencia son las siguientes: A, B₁, B₂, B₆, niacina, ácido fólico, C, D y E.

Por otra parte, algunos estudios señalan que la suplementación con vitaminas en la tercera edad puede mejorar el estado de salud del anciano. Sin embargo, se requieren estudios más exhaustivos para establecer con mayor exactitud las necesidades de vitaminas en el anciano, algunas de las cuales son función de la ingesta calórica.

Fibra

La fibra dietética, o componentes no digeribles del alimento, no es un nutriente en sentido estricto. No obstante, juega un papel importante en la utilización de los alimentos, ya que estimula la funcionalidad gastrointestinal y puede interferir en la absorción de otros nutrientes como minerales y vitaminas, debiendo ingerir entre 20-30 g/día.

Fluidos

El agua es un componente primordial de las células y también de los líquidos orgánicos. La ingestión de fluidos, en forma líquida o como constituyentes de los alimentos, es necesaria para el normal funcionamiento del organismo. En el anciano sano se recomienda una ingestión entre 1.000-3.000 mL de agua/día. En los ancianos es especialmente importante hacer cumplir esta recomendación, ya que se trata de un colectivo que tiende a reducir de manera espontánea la ingestión de agua por disminución de la sensación de sed, disminución de la accesibilidad al agua provocada por mermas en la autonomía física y psíquica, temor a incrementar la incontinencia urinaria y dificultades de deglución.

Preparación de una dieta equilibrada

La oferta de una dieta adecuada para el anciano debe hacerse atendiendo a la situación y las necesidades personales de cada individuo en concreto. Una primera aproximación para componer una dieta equilibrada está basada en el plan de los grupos básicos de alimentos, agrupados en función del valor nutritivo: 1) leche y productos

lácteos; 2) carne, pescado, legumbres, frutos secos y huevos; 3) frutas y hortalizas; 4) pan y cereales. La combinación proporcionada de los componentes de estos cuatro grupos básicos de alimentos facilita la elaboración de dietas equilibradas en los distintos nutrientes.

El seguimiento de este plan asegura niveles adecuados de todos los nutrientes con excepción del aporte calórico. También en algunos casos deben comprobarse los niveles de hierro y ácido fólico.

Entre las sugerencias, respecto a la nutrición, que deben hacerse a los ancianos y a las personas encargadas de su cuidado están las siguientes:

- Seleccionar alimentos de elevada densidad nutritiva, es decir, con gran variedad de nutrientes, evitando aquellos que básicamente sólo proporcionan calorías (dulces, alcohol, salsas...).
- Evitar alimentos con alto contenido en azúcares sencillos y sustituirlos por hidratos de carbono complejos y fibra dietética.
- Estimular un ambiente relajado y distendido durante el período de comidas llevándolas a cabo en recintos adecuados.
- Evitar la ingesta excesiva de sodio, bebidas alcohólicas y estimulantes.
- Fomentar la ingestión de comidas variadas para asegurar la presencia de todos los nutrientes y de líquidos, aconsejando los suplementos nutritivos sólo cuando se estime necesario.
- Estimular el interés por la educación de los aspectos nutritivos relativos a sus necesidades y, en su caso, la conveniencia de un régimen dietético.
- Vigilar los procesos patológicos, problemas dentales y psicológicos, así como la situación socioeconómica por su indudable incidencia sobre el estado nutritivo.



Una **alimentación adecuada** debe procurar el mantenimiento del peso ideal del anciano, con una dieta moderada en hidratos de carbono, relativamente baja en grasas y niveles equilibrados de proteínas de buena calidad. También se recomiendan alimentos ricos en fibra, minerales y vitaminas. La leche, carnes, pescados, frutas y verduras, deben encontrarse con regularidad en el plan dietético del anciano.

NUTRICIÓN Y DEPORTE

Introducción

La alimentación del deportista debe considerar las necesidades nutritivas individuales de material combustible y estructural, así como de elementos reguladores en función de la edad, el sexo y del tipo de actividad física desarrollada. Normalmente, en el caso del deportista habitual, no pueden aplicarse las ingestas recomendadas ni los objetivos nutricionales que se aconsejan en individuos no deportistas habituales, y esto es tanto más así cuanto mayor es el nivel de práctica deportiva.

Entre los mitos más antiguos, relacionados con la nutrición de los atletas, está el de la consustancialidad, según el cual se recomendaba la ingestión de grandes cantidades de alimentos ricos en proteínas (carne, leche y huevos) con objeto de reponer la masa muscular, que supuestamente se consumía durante el ejercicio. Otro mito nutritivo es el consumo masivo de píldoras, polvos y pócimas ricos en vitaminas, para potenciar la eficacia en la obtención de energía por el organismo a partir de los alimentos.

Algunos errores comunes entre los deportistas son la baja ingestión de alimentos antes de una competición, con objeto de alcanzar un determinado peso, o un consumo excesivo de alimentos, para asegurar una mayor reserva de material combustible para el ejercicio. Otra equivocación frecuente es la ingestión de soluciones hiperosmóticas con electrolitos o azúcares que, en lugar de favorecer la rehidratación, conducen a una reducción de las reservas hídricas.

Recomendaciones dietéticas

La nutrición del deportista, de acuerdo con los conocimientos científicos más recientes, debe

aportar cantidades equilibradas de hidratos de carbono, lípidos, proteínas, minerales, vitaminas y agua para asegurar tanto su salud como para alcanzar un adecuado rendimiento y recuperación en todo momento de su actividad deportiva.

Energía

La energía necesaria para el metabolismo basal, la acción termogénica de los alimentos y la actividad física procede de los hidratos de carbono, lípidos y excepcionalmente de proteínas de la dieta, los cuales a través de diferentes reacciones metabólicas pueden acumularse en el organismo, fundamentalmente como glucógeno y triglicéridos. Estos sustratos son precursores de ATP, lactato, creatín fosfato, etc., cuya utilización como fuentes de energía es función de la intensidad, frecuencia y duración del ejercicio, del entrenamiento (forma) y de la dieta seguida por el deportista.

Así, en reposo, las necesidades de ATP son bajas, de tal forma que se sintetiza suficiente ATP a partir de la oxidación de grasas con poco consumo de hidratos de carbono; sin embargo, al comienzo del ejercicio y durante un ejercicio elevado, la energía se deriva fundamentalmente de la degradación de creatín fosfato y de lactato de forma anaeróbica a partir de glucógeno. La glucosa procedente de la glucogenolisis o gluconeogénesis hepática y los ácidos grasos de los adipocitos también contribuyen al aporte energético durante el ejercicio.

La actividad deportiva y el entrenamiento afectan a las reacciones destinadas a la obtención de energía a partir de los hidratos de carbono, así como a los procesos de glucogenolisis, producción anaeróbica de lactato, gluconeogénesis y glucogénesis. La utilización relativa de hidratos de carbo-

NECESIDADES DIETÉTICAS EN EL DEPORTISTA

Energía	Necesidades aumentadas en mayor o menor medida según el tipo de ejercicio
Hidratos de carbono	Según el tipo y duración del ejercicio
Proteínas	Necesidades aumentadas, aunque los incrementos serán más o menos grandes en función del tipo de ejercicio
Lípidos	30-35% de la energía total consumida
Minerales	Mismas recomendaciones que para la población general sana
Vitaminas	Mismas recomendaciones que para la población general sana
Fluidos	Agua y bebidas isotónicas



no y lípidos como combustible durante el ejercicio depende fundamentalmente de la intensidad y duración de la actividad. En general, la utilización de hidratos de carbono se incrementa con la intensidad del ejercicio y disminuye con la duración del mismo. Durante ejercicios de alta intensidad y corta duración, el glucógeno muscular almacenado y la glucosa sanguínea son los principales suministradores de energía, mediante la vía de glucólisis anaerobia. A medida que la intensidad se reduce y aumenta la duración, los lípidos se convierten en la fuente principal de combustible por el sistema aeróbico.

Un aumento notable de las reservas de glucógeno puede que no mejore el rendimiento deportivo; sin embargo, concentraciones bajas de glucógeno parecen ser siempre una desventaja. El incremento de las reservas de glucógeno (recarga de glucógeno) en período de competición, puede alcanzarse reduciendo el entrenamiento y aumentando la ingestión de carbohidratos en los días previos a la prueba deportiva.

Hidratos de carbono

Las recomendaciones dietéticas de ingestión de hidratos de carbono por el deportista deben considerar el tipo y duración del ejercicio y también de las características de los glúcidos (Tabla 6-1).

Proteínas

Las proteínas de la dieta tienen funciones estructurales y reguladoras, y también pueden utilizarse como material combustible. El ejercicio afecta a los procesos de síntesis y degradación de proteínas en función del tipo, frecuencia, duración, etc., del mismo.

El deportista suele tener mayores requerimientos nitrogenados, no sólo por la mayor masa

muscular, sino porque hay un mayor grado de proteólisis muscular debido a la situación hormonal presente durante el ejercicio físico. Las demandas proteicas, aún siendo siempre mayores, varían en función de la modalidad deportiva, dependiendo del estrés muscular que representa la actividad deportiva. Si se calcula el aporte de proteínas en base al aporte energético las recomendaciones de proteínas para los deportistas son cubiertas adecuadamente si una vez ajustadas las demandas energéticas a la actividad física desarrollada se suministra un 10-15% de la energía a partir de este macronutriente. En los períodos de crecimiento o de ingesta de dietas deficientes en energía para alcanzar un determinado peso, es conveniente vigilar explícitamente el aporte de proteínas. Por otra parte, la ingestión de aminoácidos en cantidad masiva no está recomendada y en algunos casos pueden ser incluso tóxicos.

Lípidos

La ingestión de lípidos, además del suministro energético, también aporta material plástico y con fines homeostáticos. El deporte y el entrenamiento influyen sobre los depósitos de grasas así como en diferentes reacciones de los lípidos (lipólisis, beta-oxidación, cetogénesis, etc.). El consumo de lípidos debe adaptarse a las características individuales del deportista, aunque no existe una evidencia clara de que estos nutrientes deban aportarse en proporciones diferentes a las de colectivos comparables en cuanto a edad y sexo. Cuando una actividad física requiere un aporte de energía diario por encima de 4.500 kcal existen dificultades para ajustar la grasa a 30-35%.

Debe prestarse especial atención al aporte de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente linoleico. La razón es que favorecen la vulnerabilidad oxidativa, y dado que el ejercicio físico comporta por sus elevados requerimientos de oxígeno un es-

Tabla 6-1. RECOMENDACIONES DE INGESTA DE HIDRATOS DE CARBONO DURANTE EL EJERCICIO

Ingestión	0-60 min	Duración del ejercicio 1-3 horas	+ 3 horas
Recarga de glucógeno	Negativa	Positiva	Positiva
Bebidas azucaradas (5-10%)	[?]	Positiva	Positiva
Alimentos ricos en H. de C.	Negativa [?]	Positiva	Positiva

Tabla 6-2. RECOMENDACIONES DE INGESTA DE AGUA DURANTE EL EJERCICIO

Tiempo	Cantidad	Bebida
Antes de la actividad 1-2 horas 10-15 min	500 mL hasta 600 mL	Agua Agua, zumo de frutas diluido y bebidas glucosalinas
Durante la actividad 10-15 min	150-250 mL	Agua, zumo de frutas diluido y bebidas glucosalinas
Después de la actividad	Reponer pérdidas	Agua y bebidas diluidas

trés oxidativo, existe un riesgo evidente, al menos a largo plazo, de enfermedades ligadas a esta situación.

Minerales y vitaminas

Los minerales y vitaminas intervienen en diferentes procesos de importancia en la actividad deportiva. Así, el fósforo participa en la formación de ATP, el hierro en el transporte de oxígeno, el calcio y el sodio en la contracción muscular y conducción nerviosa, la vitamina A en la gluco-genésis y algunas vitaminas del complejo B en los procesos de obtención de energía.

En general, las recomendaciones en minerales y vitaminas tampoco difieren de las aconsejadas para individuos sanos, siempre que la ingesta energética sea adecuada. Sin embargo, la ingesta de niveles apropiados de minerales y vitaminas debe ser controlada, particularmente en aquellos deportistas cuyo peso debe mantenerse dentro de ciertos límites, como consecuencia de las características de la propia competición (judocas, jinetes, gimnastas, halterófilos, etc.), al afectarse el aporte calórico de la dieta.

Agua

El agua tiene una función estructural y también participa en el control de la homeostasis corporal (regulación de la temperatura, equilibrio osmótico, transporte, etc.). En el caso del ejercicio físico, el aporte de agua cobra especial importancia, ya que debe cubrir las pérdidas corporales

inherentes al mismo. En caso de no hacerlo, no sólo se ve comprometido el rendimiento deportivo sino también la salud del deportista. La actividad deportiva condiciona por tanto la utilización y las pérdidas hídricas. El organismo debe estar acostumbrado a ingerir líquidos, tanto durante las sesiones de entrenamiento como durante la competición, para evitar situaciones de deshidratación con disminución del rendimiento deportivo, y no esperar a tener sensación de sed (Tabla 6-2).

La primera elección es el agua, ya que las pérdidas por el sudor son hipotónicas, aunque también ciertos preparados comerciales con cantidades controladas de electrolitos, que favorecen la absorción de agua, o glucosa (5-10%), pueden ser consumidos. No obstante, a pesar de la opinión generalizada de que estas soluciones mejoran la capacidad muscular, no se dispone de datos fiables de su utilidad en el corto período que dura una competición o encuentro (1-2 horas).

Ayudas ergogénicas

Algunas ayudas ergogénicas, destinadas a mejorar el rendimiento deportivo a través de un aumento de la producción de energía, el control del consumo o de la elevación del rendimiento ener-

AYUDAS ERGOGÉNICAS



- Fisiológicas (autotransfusión,...)
- Biomecánicas (equipamiento,...)
- Psicológicas (grupos,...)
- Farmacológicas (autorizadas y prohibidas)
- Nutricionales (aminoácidos, vitaminas,...)

gético no tienen fundamento nutricional. Así, se han propuesto los suplementos de aminoácidos y vitaminas, el aceite de germen de trigo, el polen, la miel, la gelatina, la carnitina, etc., como posibles ayudas ergogénicas para el deportista, sin una base científica firme, presentando en algunos casos incluso ciertos problemas de toxicidad.

Una dieta variada y repartida a lo largo del día asegura, en la práctica, una adecuada distribución de los nutrientes energéticos: proteínas (10-15%), lípidos (30-35%) e hidratos de carbono (50-60%), así como la presencia de vitaminas y minerales para cubrir las necesidades específicas del deportista.

Nutrición y estado nutricional

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

1. Definir y comprender los conceptos básicos relativos al estado nutricional y su evaluación.
2. Valorar los factores que condicionan el estado nutricional del individuo.
3. Identificar los métodos de evaluación nutricional del individuo.
4. Comprender las condiciones básicas necesarias para interpretar y valorar el estado nutricional.
5. Identificar las interacciones entre los métodos de evaluación nutricional y la condición física, mental y fisiológica del individuo.

ESTADO NUTRICIONAL: CONCEPTOS PRELIMINARES

La evaluación del estado nutricional de un individuo o colectividad consiste en la determinación del nivel de salud y bienestar desde el punto de vista de su nutrición y depende del grado en que las necesidades fisiológicas, bioquímicas y metabólicas de nutrientes estén cubiertas por la ingestión de alimentos en la dieta. Este equilibrio dinámico entre demandas y requerimientos está afectado por factores diversos como la edad, sexo, actividad desarrollada, situación fisiológica, situación patológica, educación cultural y situación psicosocial.

En este sentido, la evaluación del estado nutricional requiere un examen del peso, la composición corporal, la condición física y la situación funcional de diferentes tejidos y órganos. También exige la determinación de diferentes variables bioquímicas relacionadas con el metabolismo de los nutrientes y el estudio de la calidad y cantidad de los principios inmediatos de la dieta. Adicionalmente, es conveniente recopilar información acerca de la situación fisiopatológica, el comportamiento, la educación y los hábitos alimentarios, la prescripción farmacológica y otros aspectos psicosociales, genéticos y ambientales dado que estos factores también pueden afectar al estado nutricional.

Una nutrición equilibrada implica un aporte adecuado en nutrientes y energía, específico para cada individuo. La deficiencia prolongada de un determinado nutriente conduce a su desaparición progresiva en los tejidos, posteriormente a alteraciones bioquímicas y finalmente a manifestaciones clínicas, características de su defecto en la dieta. Por otra parte, ingestas excesivas de uno o varios nutrientes pueden desarrollar situaciones de obesidad o toxicidad.

OBJETIVOS DE LA EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL



1. Detección temprana y sistemática de grupos de pacientes con riesgo de malnutrición (por exceso o defecto).
2. Establecimiento de los valores basales para controlar la eficacia de diferentes regímenes dietéticos.
3. Desarrollo de programas de salud y nutrición para la población.

Con la finalidad de facilitar la valoración nutricional, el organismo suele considerarse dividido en seis compartimentos: grasa, piel y esqueleto, masa extracelular, proteínas plasmáticas, proteínas viscerales y proteínas somáticas. El impacto de la nutrición sobre cada uno de estos compartimentos, estimado mediante diferentes técnicas evaluadoras, permite establecer un diag-

nóstico de las posibles situaciones de malnutrición, tanto por exceso como por defecto en la ingestión de nutrientes.

EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL

Un proceso de valoración exhaustiva del estado nutricional de un individuo o una colectividad incluye la recopilación de diferentes tipos de información: datos antropométricos y bioquímicos, historia clínica y exploración física, historia dietética y aspectos psicosociales. No existe, por el momento, una medida o criterio único, que permita describir de una forma objetiva la salud óptima desde el punto de vista de la nutrición, por lo que el conjunto de medidas y determinaciones, que integran la valoración del estado nutricional, son necesarios para conocer las interacciones entre la situación fisiopatológica, la situación psicosocial y la ingestión de nutrientes y su influencia sobre la composición corporal, los análisis hematológicos y bioquímicos y las funciones fisiológicas del individuo (Tabla 7-1).

Medidas antropométricas

Los datos y valoraciones antropométricos están basados en la comparación de distintas medidas corporales respecto a patrones apropia-

Tabla 7-1. UTILIDAD DE CADA UNO DE LOS TIPOS DE TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL

Determinación	Evaluación	Detección
Antropometría	Situación fisiopatológica	Obesidad, desnutrición crónica y actual Composición corporal
Hematología y Bioquímica	Metabolismo de nutrientes	Malnutriciones específicas de nutrientes
Historia dietética	Ingesta de nutrientes	Deficiencias y excesos de aporte de nutrientes
Historia clínica y examen físico	Datos clínicos y anamnesis	Deficiencias específicas de nutrientes
Informe psicosocial	Factores ambientales, sociales, económicos, etc.	Educación y hábitos alimentarios

dos. Estas determinaciones, que permiten cuantificar algunos de los compartimentos corporales, deben ser realizados por personal experimentado y con instrumental adecuado.

Los objetivos más destacables de la antropometría son: a) evaluación del estado nutricional, b) control del crecimiento, desarrollo y maduración y c) valoración del efecto de intervenciones nutricionales. La información antropométrica permite detectar situaciones de malnutrición de carácter crónico o actual, que afectan fundamentalmente a aspectos energéticos, proteicos y de composición corporal.

El equipo necesario para llevar a cabo las valoraciones antropométricas incluye balanza y tallímetro de precisión, compás de medidas del pliegue subcutáneo o lipocalibrador, nonius y cinta métrica inelástica. Para la interpretación de los datos obtenidos debe considerarse la edad, el sexo y el estado fisiopatológico del individuo. Las medidas antropométricas directas obtenidas con estos instrumentos son las siguientes:

- Peso y altura.
- Envergadura del codo o muñeca.
- Perímetro del brazo.
- Pliegues cutáneos: tricipital, subescapular, suprailíaco, bicipital y abdominal.

Otras variables elaboradas a partir de las medidas anteriores son:

- Complejión.
- Superficie corporal y metabolismo basal.
- Perímetro y área muscular del brazo.
- Índice peso/altura (índice de Quetelet o índice de masa corporal).
- Porcentaje de grasa corporal.
- Índice adiposo muscular.

La determinación de la complejión, la superficie corporal y el metabolismo basal son de interés como valores de referencia, mientras que el resto de los índices aportan fundamentalmente información sobre el contenido en proteínas y grasas del organismo.

Peso, altura y complejión

Las determinaciones del peso y la altura son medidas primarias por su sencillez y la información que facilitan en la valoración nutricional. El peso corporal y la estatura de una persona están

Tabla 7-2. PUNTOS DE CORTE PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA COMPLEJIÓN

	Varones	Mujeres
Pequeña	> 10,4	> 11,0
Media	9,6-10,4	10,1-11
Grande	< 9,6	< 10,1

estrechamente relacionadas. Así, los diferentes patrones de peso aconsejable han sido elaborados en función de la altura. Otros factores que deben tenerse en cuenta al comparar estas variables con las tablas de referencia son la edad, el sexo y la complejión (Tabla 7-2).

Las determinaciones de peso y altura deben realizarse en unas condiciones prefijadas. En general, en posición erguida, sin zapatos y con ropas ligeras. La interpretación de los resultados se basa en la comparación con el valor de referencia o peso tabulado según la ecuación:

$$\% \text{ Peso} = (\text{Peso "real"} / \text{Peso "tabulado"}) \times 100$$

Valores por debajo del 90% se consideran como propios de desnutrición moderada, mientras que valores del 110 al 120% o superiores al 120%, como situaciones de sobrepeso u obesidad, respectivamente. En líneas generales, con el paso de los años, el peso corporal tiende a aumentar ligeramente.

La complejión se puede establecer por el criterio de la envergadura del codo determinado con nonius o también a partir del cociente entre la estatura y la circunferencia de la muñeca.

$$r = \frac{\text{Talla (cm)}}{\text{circunferencia de la muñeca (cm)}}$$

La complejión se estima a partir de la tabla 7-1. La determinación del peso, además de interpretarse en función de la altura, permite detectar los posibles cambios en el mismo por diversas circunstancias (enfermedad, envejecimiento, etc.). El porcentaje de pérdida de peso puede calcularse por la ecuación:

$$(+/-) \Delta \text{ Peso} = (\text{Peso habitual} - \text{Peso actual} / \text{Peso habitual}) \times 100$$

En general, pérdidas de peso superiores al 5% en un mes o al 10% en 6 meses son indicativas de desnutrición.

Perímetro del brazo

El valor del perímetro braquial en el punto medio entre el acromion (apéndice de la clavícula) y el olecranon (apéndice del húmero) constituye una medida indirecta de los depósitos de proteína de la persona. La determinación del perímetro del brazo (en mm) se lleva a cabo con una cinta métrica inelástica (Fig. 7-1).

La interpretación de los datos se realiza a partir de tablas de referencia y su comparación con los valores medios o con el percentil correspondiente. Valores inferiores al 90% del valor medio o situados en percentiles por debajo de 25 suelen considerarse indicativos de desnutrición moderada y valores inferiores al 60% o situados en un percentil menor de 10, indicativos de desnutrición severa.

Pliegues cutáneos

La determinación de los pliegues cutáneos en diferentes partes del cuerpo (bíceps, tríceps, escápula o abdomen) constituye un método práctico y ampliamente utilizado para la predicción de la grasa corporal (Fig. 7-2), y en particular de la grasa



Figura 7-1. Medida del perímetro del brazo.

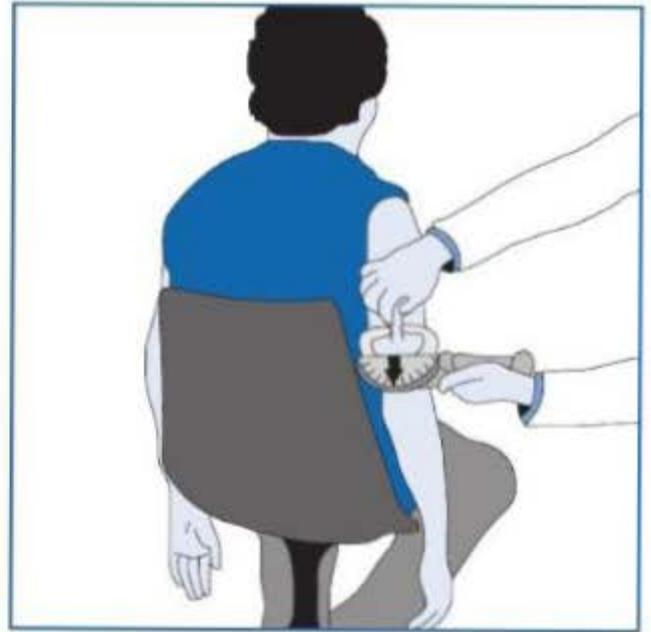


Figura 7-2. Medida del pliegue tricípital con un lipocalibre.

subcutánea, que representa aproximadamente el 50% del total.

La técnica para medir el pliegue tricípital, el más frecuente en la rutina clínica, consiste en situar al individuo en bipedestación o sentado y aplicar el lipocalibre en el punto medio posterior, entre el acromion y el olecranon durante tres segundos. Este compás debe ejercer una presión constante en la zona del tríceps en el momento de la lectura. Esta medida se realiza por duplicado y el valor medio se compara con los valores de referencia, cuya interpretación también puede hacerse con relación al percentil.

Composición corporal

Otro de los aspectos más interesantes para el conocimiento del estado nutricional, y que ofrece una mayor dificultad para su evaluación es la determinación de la composición corporal, con particular referencia al contenido lipídico y proteico.

Existen diferentes métodos para cuantificar la composición corporal basados en técnicas radioactivas (K^{40} y agua tritiada), de conductividad eléctrica (bioimpedancia), de densitometría, de activación de neutrones, etc., que en general requieren tecnología sofisticada y de difícil aplicación en estudios rutinarios.

En consecuencia, se han descrito metodologías alternativas, que indirectamente permiten

evaluar la composición corporal, en particular los compartimentos grasos y proteicos, entre los que sobresalen: el índice de Quetelet (IQ), el índice adiposo-muscular (IAM) y el porcentaje de grasa corporal obtenido a partir del pliegue tricipital.

El índice de masa corporal permite detectar con rapidez las posibles situaciones de malnutrición, y en particular de obesidad, al relacionar peso y altura según la fórmula:

$$\text{IMC} = \text{Peso (kg)} / \text{Altura}^2 \text{ (m)}$$

Este cociente tiene una baja correlación con la altura, mientras que es relativamente alta con el porcentaje de grasa corporal. El documento de consenso de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) establece en la tabla 7-3 la interpretación de los valores del IMC.

También se puede estimar el porcentaje de grasa corporal a partir de los valores del pliegue tricipital (PT), que se relacionan con la densidad (d), de acuerdo con la ecuación de Siri:

$$\% \text{ grasa} = [(4,95/d) - 4,5] \times 100$$

donde la densidad,

$$d \text{ (varones)} = 1,1143 - 0,0618 \times \log \text{ PT}$$

$$d \text{ (mujeres)} = 1,1278 - 0,0775 \times \log \text{ PT}$$

Tabla 7-3. INTERPRETACIÓN DE LOS VALORES DEL IMC

Categoría	Valores límite IMC (kg/m ²)
Peso insuficiente	< 18,5
Peso normal	18,5-24,9
Sobrepeso grado I	25-26,9
Sobrepeso grado II (preobesidad)	27-29,9
Obesidad grado I	30,0-34,9
Obesidad grado II	35,0-39,9
Obesidad grado III (mórbida)	40,0-49,5
Obesidad grado IV (extrema)	> 50,0

El contenido de agua corporal de personas sanas puede ser calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Agua (varones)} = 79,4 - 0,24 \times p \text{ (kg)} - 0,15 \times E \text{ (años)}$$

$$\% \text{ Agua (mujeres)} = 69,8 - 0,20 \times p \text{ (kg)} - 0,2 \times E \text{ (años)}$$

Pruebas bioquímicas y hematológicas

Los análisis bioquímicos y hematológicos constituyen una parte importante de la valoración del estado nutricional. En esa línea, se han desarrollado diferentes pruebas y ensayos que relacionan los niveles de ingesta con el metabolismo de los distintos nutrientes.

Las muestras se obtienen normalmente de sangre, orina, heces y, más ocasionalmente, a partir de biopsias o tejidos cuyo análisis permite valorar concentraciones de nutrientes (glucosa, lípidos, albúmina, minerales, vitaminas, etc.), metabolitos (urea, creatinina, etc.) o enzimas implicados en diferentes vías metabólicas (transaminasas, fosfatasa, glutatión reductasa, etc.), índices relacionados con la utilización de nutrientes (hemoglobina y hematocrito, recuento de eritrocitos, transferrina, carga de triptófano, etc.), así como posibles situaciones de inmunodeficiencia (fórmula leucocitaria, pruebas de hipersensibilidad, etc.).

En algunos casos existen ensayos que combinan medidas antropométricas y bioquímicas (índice de creatinina-altura) y pruebas bioquímicas con informes dietéticos (balance de nitrógeno).

Algunos de los factores que deben tenerse en cuenta en la valoración del estado nutricional a través de parámetros bioquímicos son la edad, el sexo, la herencia genética, las interacciones entre nutrientes y entre fármacos y nutrientes, así como la situación fisiopatológica. Otras limitaciones de estas pruebas son debidas a la ausencia de ensayos fiables y sensibles, así como las dificultades para establecer los valores límites en algunos nutrientes y delimitar las variaciones normales individuales.

En cualquier caso, una prueba o análisis bioquímico para la valoración del estado nutricional debe reunir las cualidades de sensibilidad, especificidad y repetibilidad. En la actualidad, los laboratorios dedicados a la valoración del estado nutricional disponen de equipos y técnicas que permiten la realización de los distintos ensayos

con rapidez, gran resolución y de forma automatizada. Por último, otros criterios para la elección de las pruebas bioquímicas y hematológicas deben estar basadas en la economía y en la sencillez.

Valoración del metabolismo proteico

La estimación funcional de los depósitos de naturaleza somática, mediante pruebas bioquímicas, se fundamenta en las determinaciones de la eliminación urinaria de 3-metilhistidina, creatinina y del índice creatinina-altura (ICA). La proteína visceral puede ser evaluada a partir de análisis de albúmina, transferrina y otras proteínas plasmáticas (prealbúmina, proteína que une retinol, etc.). Esta última es una técnica especialmente importante a nivel hospitalario.

En combinación con datos de la ingestión de proteína puede obtenerse el balance de nitrógeno (BN):

$$BN = (IP/6,25) - (NU + 4)$$

Siendo:

BN: balance de nitrógeno (g/día)

IP: ingesta proteica (g/día)

UN: nitrógeno ureico (g/día)

A partir de datos de urea y aminoácidos plasmáticos puede calibrarse la calidad de la proteína de la dieta. Existen otras técnicas más sofisticadas que permiten cuantificar los procesos de síntesis y degradación proteica, pero no son de utilidad en la rutina clínica diaria.

Valoración del metabolismo hidrocarbonado

La glucemia basal tras pruebas de carga, junto con determinaciones de insulina y lactosemia suelen ser los índices más comunes de valoración bioquímica del metabolismo y utilización nutritiva de los glúcidos.

Valoración de metabolismo lipídico

Diferentes estudios han indicado que los niveles de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-coles-

terol y triglicéridos, junto con la cuantificación de las apoproteínas A y B, suelen ser de gran interés para detectar posibles hiperlipidemias y alteración de la utilización nutritiva de los lípidos.

Valoración de la utilización y metabolismo de las vitaminas

La detección de la ingestión inadecuada de vitaminas hidrosolubles del complejo B o alteraciones en su metabolismo se lleva a cabo fundamentalmente por su cuantificación en orina, en sangre o eritrocitos, y también evaluando la actividad funcional de algunos enzimas, donde estas vitaminas actúan como coenzimas o cofactores como transcetolasa eritrocitaria (tiamina), glutathion reductasa (riboflavina), relación de transaminasas (B_6) o excreción de metabolitos como metilnicotinamida (niacina), ácido metilmalónico (vitamina B_{12}) o ácido iminoformil glutámico (ácido fólico).

Los niveles de vitamina C, incluidos en la dieta o en suplementos vitamínicos, pueden ser controlados en función de los valores de ácido ascórbico en sangre, en orina y en los leucocitos.

La determinación de parámetros bioquímicos indicadores del estado nutricional de las vitaminas liposolubles A, D y E también ofrece gran interés, ya que la insuficiencia nutricional de estos nutrientes suele ser relativamente común. La técnica de evaluación del estado nutricional relativo a estas vitaminas, además de su cuantificación en plasma y orina, incluyen la determinación de fosfatasas alcalinas (vitamina D), la prueba de hemólisis eritrocitaria con H_2O_2 (vitamina E) y la valoración de la proteína transportadora de retinol (vitamina A). La vitamina K puede determinarse a través de pruebas funcionales (tiempo de coagulación).

Valoración de la utilización de minerales

Las técnicas de valoración del estado nutricional en relación al hierro, para detectar deficiencias nutricionales o alteraciones metabólicas, son muy variadas. Entre las más sensibles, y por tanto de elección, están las determinaciones de ferritina sérica y del porcentaje de saturación de

la transferrina. También pueden utilizarse el valor hematocrito, la hemoglobina, la protoporfirina, el recuento de eritrocitos y el hierro sérico como indicadores de la situación nutritiva respecto a este mineral así como la fórmula eritrocitaria.

Aunque no existen pruebas bioquímicas rápidas y fiables indicativas de la ingestión de calcio o de alteraciones en su metabolismo, suelen utilizarse como índices indirectos el balance de calcio y el análisis de fosfatasas alcalinas.

La valoración bioquímica de zinc se basa en el estudio de los niveles plasmáticos o contenido de zinc en el pelo, mientras que en el caso del yodo suelen utilizarse los niveles de proteína plasmática transportadora de yodo, el yodo urinario y pruebas de la función tiroidea. El resto de los minerales pueden evaluarse a través de la determinación de sus concentraciones en sangre u orina.

Pruebas de valoración de la respuesta inmune

También se suelen incluir, dentro de las pruebas bioquímicas, diferentes ensayos destinados a determinar la capacidad de respuesta inmune del individuo, ya que la malnutrición suele acompañarse de fenómenos de inmunodeficiencia. Las técnicas de evaluación del grado de competencia inmunitaria constituyen un método muy interesante para evaluar, de forma dinámica y global, el estado nutricional.

Las determinaciones más frecuentes encaminadas a la evaluación de la capacidad del sistema inmune son la fórmula leucocitaria, el recuento de linfocitos B y T (responsables de la inmunidad humoral y celular, respectivamente) y pruebas de hipersensibilidad con diferentes antígenos como candidina, tuberculina (PPD), dinitrobenceno (DNTB), estreptocinasa-estreptodornasa (SK-SD), tricofilina, etc. Otras determinaciones interesantes, pero más complejas son: el análisis de las proteínas del complemento, de las inmunoglobulinas y el estudio de proliferación linfoblástica frente a diferentes mitógenos.

Historia dietética

La determinación de la ingesta de nutrientes es una de las bases para el estudio del estado nu-

tricional, ya que permite identificar primariamente posibles alteraciones nutricionales causadas directamente por una dieta desequilibrada. En general, la historia dietética no se utiliza específicamente como medio de diagnóstico, sino como fuente complementaria de información para ser estudiada conjuntamente con los datos antropométricos y bioquímicos y la exploración física (Tabla 7-4).

El registro y la evaluación de la ingesta dietética de un individuo o de una población es uno de los aspectos más problemáticos y también frustrantes de la valoración nutricional. La dificultad para cumplimentar un cuestionario de tipo dietético sin influenciar al entrevistado, la imposibilidad práctica de pesar y conocer exactamente la composición de cada uno de los alimentos ingeridos y la incapacidad para recordar los tipos y cantidades de alimento ingeridos, son algunas limitaciones de esta técnica. También requiere una cuidada formación del personal entrevistador y selección de los días de encuesta.

Entre los métodos empleados para llevar a cabo la historia dietética están los siguientes:

- Recuerdo de 24 horas.
- Cuestionario de frecuencia.
- Diario dietético durante 5-7 días.
- Control de compras y consumo de alimentos.

En general, es aconsejable realizar al menos dos de estos métodos con objeto de detectar posibles lagunas y errores.

La información obtenida a partir de los cuestionarios dietéticos debe ser transformada en términos de cantidades de nutrientes y energía. Esta conversión se puede llevar a cabo clasificando los alimentos en función de los cuatro grupos básicos de alimentos, o bien utilizando unas tablas de composición de alimentos.

Para la interpretación de los resultados obtenidos con las encuestas dietéticas de una población dada se procede a la comparación con las tablas de ingestas recomendadas (IR o RDA), mientras que en el caso de individuos aislados éstas sólo sirven como orientación.

La educación y los ingresos económicos son factores importantes en los buenos hábitos dietéticos de la población. En ocasiones, se aprovecha la encuesta dietética para obtener información psicosocial que puede condicionar la ingesta de alimentos.

Tabla 7-4. CONTROL DE ALIMENTOS INGERIDOS EN 24 HORAS

Filiación					Fecha:			
Hora	Tipo de alimento	Cantidad	Grupo de la leche	Grupo de la carne	Grupo de las frutas y verduras	Grupo del pan y los cereales	Aceite, mantequilla, etc.	Dulces, azúcar
Total								
Ración media			125-250 g	100-200 g	150-250 g	20-50 g	Variable	Variable
N.º de raciones								
Recomendaciones dietéticas (adulto)			2	2	4	4	2 cucharadas	
Evaluación B = Baja A = Adecuada E = Excesiva								

Historia clínica y exploración física

La valoración del estado nutricional se acompaña de una historia clínica en la que se recogen los datos de identidad, los antecedentes patológicos, personales y familiares, el tratamiento farmacológico, una anamnesis por aparatos y una exploración física. Otros aspectos que se investigan en la historia clínica son las pérdidas de peso recientes, los problemas gastrointestinales y traumatismos, la situación socioeconómica, las alteraciones sensoriales, las drogodependencias y las enfermedades crónicas con posible incidencia sobre el estado nutricional.

Habitualmente, los signos y síntomas de malnutrición o deficiencia nutricional no son evidentes y su reconocimiento requiere personal médico especializado. Las situaciones de desnutrición proteica o proteicocalórica son más frecuentes que los trastornos asociados con síndromes específicos por deficiencia de vitaminas o de minerales.

La presión arterial y el metabolismo basal también se suelen incluir en la historia clínica. Por último y como se ha apuntado anteriormente, la historia clínica debe considerar la influencia del estado nutricional sobre la patogénesis, las enfermedades comunes y las deficiencias nutricionales específicas, así como cuestiones sobre la mastica-

ción y deglución, alteraciones de la salivación, estado de boca, posibles alergias alimentarias, apetito y cambios de peso recientes.

Conjuntamente con la historia clínica, la valoración del estado nutricional exige una exploración física, donde merecen especial atención la piel, el pelo, los dientes, la lengua, las encías, los labios y los ojos, al ser zonas con elevada capacidad de regeneración y que pueden evidenciar signos tempranos de malnutrición. Algunas alteraciones nutritivas pueden también manifestarse con trastornos a nivel gastrointestinal.

A lo largo de la consulta médica y la exploración física debe profundizarse en aspectos relacionados con la conducta de alimentación, así como alteraciones funcionales en los sistemas neuromuscular, digestivo, cardiovascular y el tejido subcutáneo, que en ocasiones pueden no ser evidentes al facultativo y aparecen como consecuencia de entrevistas con familiares cercanos.

En general, las posibles situaciones de malnutrición obtenidas a través del examen físico e historia clínica han de ser confirmadas por los informes antropométricos, bioquímicos y dietéticos.

Información psicosocial

En la evaluación del estado nutricional tiene también importancia el examen del estado psíquico, el comportamiento, la educación y las actitudes frente a la comida. Estos aspectos condicionan, en ocasiones, no sólo su estado nutricional sino también la situación fisiopatológica.

El estilo de vida, la situación económica, el ambiente cultural y factores étnicos, también tienen gran influencia sobre los patrones nutricionales seguidos y deben ser considerados en la evaluación del estado nutricional.

Una información psicosocial detallada permite detectar problemas nutricionales y alertar al facultativo sobre posibles signos de deficiencias futuras, por lo que aspectos como la edad, el sexo, la situación civil, las enfermedades y la ocupación también pueden aportar luz en el asesoramiento dietético.

Índices pronóstico

Recientemente, diversos grupos de investigadores han intentado correlacionar diferentes parámetros de valoración del estado nutricional, con el riesgo de morbilidad y mortalidad de una determinada población o individuo. Estos criterios o índices pronósticos (IP) orientan sobre el grado de salud dependiente de la nutrición combinando datos antropométricos, bioquímicos, inmunológicos y clínicos mediante fórmulas como la siguiente:

$$IP = 158 - 16,6 \times A - 0,78 \times PT - 0,2 \times T - 5,8 \times DH$$

donde:

A: albúmina expresada en g/dL

T: transferrina expresada en mg/dL

PT: pliegue tricípital expresado en mm

DH: respuesta alérgica (DH = 0, anergia; DH = 1, respuesta 5 mm; DH = 2, respuesta 5 mm)

Con este índice se consideran pacientes de riesgo nutricional a aquellos con valores del IP mayores de 50.



VALORACIÓN NUTRICIONAL

La valoración del estado nutricional consiste en el estudio de la incidencia de la nutrición sobre la salud. Una evaluación exhaustiva a nivel nutricional debe basarse en la recopilación de datos antropométricos, bioquímicos y hematológicos, así como de información procedente de la exploración física, la historia clínica, los cuestionarios dietéticos y los informes psicosociales, para los que existen diferentes modelos de protocolos.

La interpretación del conjunto de estos datos constituye el criterio más fiable para el diagnóstico de situaciones de desnutrición y obesidad y para el estudio de las características e influencia del régimen dietético sobre la composición corporal (proteína y grasa fundamentalmente), el metabolismo de los nutrientes y los procesos nutricionales o fisiopatológicos derivados.

Interacciones entre fármacos y nutrientes

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

1. Definir las características y determinantes en las interacciones entre fármacos y nutrientes.
2. Clasificar las interacciones entre fármacos y nutrientes.
3. Valorar los efectos de las interacciones entre fármacos y nutrientes.
4. Explorar las poblaciones de riesgo y las medidas a tomar para la prevención de la aparición de interacciones entre fármacos y nutrientes.

INTRODUCCIÓN

La administración de medicamentos con fines terapéuticos y una adecuada utilización nutritiva de los alimentos son elementos esenciales en el tratamiento de patologías diversas. En este contexto, las interacciones fármacos-nutrientes hacen referencia a las influencias mutuas entre la alimentación y las pautas farmacológicas, que afectan tanto al estado nutricional del individuo como a la disponibilidad, seguridad y efecto terapéutico de los medicamentos.

Las interacciones entre fármacos y nutrientes consideran tanto las que ocurren en los alimentos y medicamentos como aquellas que afectan a la estabilidad o disponibilidad de los componentes de los mismos en el organismo como consecuencia de compartir rutas comunes en su digestión y liberación, absorción, metabolismo, distribución y excreción.

Los resultados de estas influencias en la acción y utilización de los fármacos y de los alimentos pueden ser beneficiosos, adversos o inocuos. Por otra parte, algunos nutrientes, particularmente aminoácidos, minerales (Ca, Fe, etc.) y vitaminas (A, D, niacina, etc.) han sido empleados a dosis farmacológicas con fines terapéuticos.

En este sentido, los efectos farmacológicos o secundarios de un determinado principio activo pueden afectar a la ingestión y metabolismo de nutrientes,

a sus necesidades nutritivas y al estado nutricional o grado de salud dependiente de su nutrición, mientras que algunos alimentos o sus componentes (nutrientes y no nutrientes) pueden modificar la acción farmacológica de un fármaco por cambios en su absorción, metabolismo y excreción.

DETERMINANTES Y FACTORES DE RIESGO EN LAS INTERACCIONES FÁRMACOS-NUTRIENTES

Las interacciones entre fármacos y nutrientes vienen condicionadas por una serie de determinantes que dependen de tres tipos de variables:

1. Las características del principio activo y la forma farmacéutica.
2. La dieta seguida y estado nutricional.
3. La situación fisiopatológica del paciente.

Así, dentro de las interacciones que dependen del tipo de tratamiento farmacológico se incluyen las propiedades fisicoquímicas, la formulación, la posología y la actividad farmacológica del medicamento.

El valor nutritivo de la dieta y la distribución de nutrientes y otros componentes de los alimentos, la función gastrointestinal, la distribución periódica de las comidas y el modo de administración, también pueden afectar a las interacciones fármacos-nutrientes.

Por último, las características individuales del paciente como la edad, el sexo, la herencia genética, la propia situación fisiopatológica del enfermo y su estado nutricional (obesidad, desnutrición, deficiencias, etc.) son facetas que intervienen en las eventuales interacciones entre los alimentos y los medicamentos.

Las poblaciones de riesgo respecto a la aparición de interacciones fármaco-nutrientes incluyen los niños, las mujeres embarazadas, los ancianos, los enfermos crónicos y los alcohólicos, debido a que estos individuos son más susceptibles de sufrir alteraciones en los procesos de absorción, metabolización y excreción como consecuencia de una singular situación fisiopatológica.

Otros aspectos que deben considerarse de riesgo en la emergencia de interacciones son la duración del tratamiento, el número de fármacos administrados y las patologías que afectan al tracto gastrointestinal, el sistema hepatobiliar y la función renal.

CLASIFICACIÓN DE INTERACCIONES FÁRMACOS-NUTRIENTES

Los sistemas de clasificación de las interacciones fármacos-nutrientes son múltiples. El uso de bases de datos, partiendo desde diferentes perspectivas, permite un acceso rápido a las interacciones conocidas.

La utilidad de estas bases de datos y de los diferentes criterios de clasificación se ha puesto de manifiesto como elemento de diagnóstico y prevención en la práctica clínica, pero también en la investigación y en la formación de los profesionales sanitarios.



CATEGORIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN FÁRMACO-NUTRIENTE

La forma de categorizar las interacciones entre fármacos y nutrientes más ampliamente aceptada y divulgada consiste en considerar los dos siguientes aspectos:

- Influencia de la dieta, nutrientes y estado nutricional sobre la eficacia y seguridad de la respuesta farmacológica.
- Influencia de los medicamentos sobre la utilización de nutrientes y el estado nutricional.

Algunos nutrientes (niacina, vitamina A, etc.) administrados en dosis elevadas han sido utilizados como fármacos en muy diversas patologías, así como una serie de preparados acogidos de forma genérica bajo la denominación de productos dietéticos, mientras que algunos medicamentos pueden ser considerados como fuentes de nutrientes (sales cálcicas, excipientes, etc.). También algunos alimentos pueden tener acciones farmacológicas, que en general son ligeras, pero que pueden complementar el efecto terapéutico de algunos fármacos como es el caso de las cebollas (acción fibrinolítica), regaliz (retención de sodio), especias con salicilatos (analgesia), etcétera.

INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN EN LA RESPUESTA FARMACOLÓGICA

La alimentación puede incidir sobre la eficacia, tolerancia y seguridad de los medicamentos a

CRITERIOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE INTERACCIONES FÁRMACO-NUTRIENTE



1. Por la localización de la interacción (estómago, intestino, hepatocito, etc.).
2. Por el mecanismo fisicoquímico de la interacción *in vivo* e *in vitro* (adsorción, precipitación, solubilización, oxidación, regulación, etc.).
3. Por el grupo farmacológico (antibióticos, tranquilizantes, etc.).
4. Por los nutrientes implicados (minerales, vitaminas, etc.).
5. Por la farmacocinética de la interacción (absorción, metabolismo, distribución, excreción, etc.).
6. Por el grupo de pacientes o población afectados (diabéticos, ancianos, alcohólicos, etc.).
7. Por la secuencia temporal de aparición de interacciones (inmediata, horas, días).
8. Por la importancia y trascendencia clínica de la situación (adversa/favorable).
9. Por las interacciones farmacodinámicas entre fármacos y determinados componentes nutritivos y no nutritivos de los alimentos (agonistas y antagonistas).

través de diferentes mecanismos. Así, los alimentos pueden interactuar con los medicamentos a través de cambios en los procesos de: liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación de fármacos, induciendo modificaciones en la acción farmacológica esperada.

Además, las interacciones de nutrientes específicos, las características de la administración y técnica culinaria (volumen, consistencia...), y distribución temporal, junto con el estado nutricional previo del paciente, influyen sobre la eficacia y seguridad terapéutica.

Liberación del fármaco

La ingesta de alimentos condiciona el pH, la motilidad y las secreciones gastrointestinales, que a su vez pueden modificar los procesos de disgregación y solubilidad de los principios activos de una determinada formulación. Otros factores como la forma farmacéutica (sólida o líquida), solubilidad del fármaco, el tamaño de

partícula, la ionización y la formación de complejos también deben ser considerados al estudiar la influencia de la alimentación sobre la liberación de fármacos administrados por vía oral.

Absorción del fármaco

Los alimentos en general o ciertos componentes de los alimentos pueden afectar a los procesos de absorción de fármacos a través de interacciones fisicoquímicas o a través de modificaciones en las condiciones fisiológicas a nivel gastrointestinal, que aumentan, reducen o retrasan su efecto terapéutico.

Así, los alimentos alteran la viscosidad y el pH del medio así como la forma química, la solubilidad y la disociación de los fármacos, todo lo cual incide en su absorción.

La ingesta de bebidas junto con alimentos también influye sobre la absorción a través de cambios en la disolución, la osmolaridad, distensión de la pared intestinal y velocidad de tránsito gastrointestinal.

Los cambios fisiológicos ocasionados por los alimentos en el tracto gastrointestinal y que inciden sobre la absorción de fármacos incluyen: modificaciones en el vaciado gastrointestinal mediados por la composición de la dieta, su consistencia y la temperatura de ingestión; modificaciones en la motilidad e irrigación gastrointestinal; modificación en secreciones gastrointestinales y hepato-biliares con efectos selectivos sobre medicamentos de diversa naturaleza (proteínas, lípidos, etc.); y modificaciones en el aclaramiento, persistencia o biotransformación a nivel de la mucosa gastrointestinal y de los hepatocitos.

En algunos casos concretos pueden existir interacciones más complejas en las que se presentan fenómenos de adsorción a la fibra por determinados fármacos, de reacciones de formación de compuestos insolubles, o incluso de procesos de competencia por transportadores específicos.

Distribución del fármaco

La distribución del fármaco por el torrente circulatorio tras su administración por diferentes

vías, se realiza fundamentalmente unida a proteínas plasmáticas y en menor medida en forma libre.

La nutrición juega un papel importante en el control de los niveles de proteínas plasmáticas y el posible desplazamiento de algunos fármacos por nutrientes específicos en algunos tipos de interacciones encontradas en pacientes con desnutrición o con edema.

Metabolismo de los fármacos

Algunos componentes de los alimentos pueden influir en las reacciones de óxido-reducción y conjugación que fundamentalmente intervienen en la biotransformación de los medicamentos para facilitar su eliminación. En este sentido, los sistemas enzimáticos (oxidases, conjugasas,...) que participan en estos procesos de metabolización pueden estar inducidos o inhibidos por los alimentos con un resultado de ineficacia terapéutica o riesgo de toxicidad.

La distribución de sustratos energéticos (proteínas, lípidos e hidratos de carbono), algunas vitaminas (C, D), la calidad de la proteína y algunos aminoácidos azufrados, componentes de los alimentos y bebidas, fibra (metilxantinas, flavonas, indoles,...) son factores que afectan a la eficacia y seguridad de los fármacos.

Así, dietas hiperproteicas, alimentos ricos en flavonoides (vegetales), indoles (coles, repollos,...), metilxantinas (té, café), hidrocarburos policíclicos (carnes ahumadas y braseadas) tienden a disminuir la vida media del fármaco por aumento de los procesos de metabolización, mientras que dietas ricas en glúcidos e hiperlipídicas disminuyen la actividad enzimática prolongando el tiempo de la acción farmacológica con riesgo de presentar toxicidad.

Algunos aditivos (BHA, BHT,...) y contaminantes (pesticidas, metales,...) también pueden desarrollar procesos de inducción o inhibición enzimática sobre los procesos de biotransformación de los fármacos.

Excreción urinaria

La naturaleza de la dieta (alcalina o ácida) juega un papel importante en la eliminación de

fármacos a través de la orina, ya que regula los procesos de reabsorción a nivel del túbulo renal.

Otro factor de posible interacción entre fármacos y nutrientes son los efectos antagonistas sobre transportadores específicos, que afectan a la permanencia del fármaco en el organismo.

Estado nutricional y la eficacia terapéutica de los fármacos

La acción farmacológica está en función del estado nutricional o grado de salud dependiente de la nutrición del paciente en etapas previas. Así, la composición corporal (contenido de grasa, masa magra y agua) juega un papel importante en la distribución de formas de naturaleza liposoluble o hidrosoluble y su efecto terapéutico, mientras que situaciones de desnutrición proteicoenergética provocan una menor degradación y conjugación de los medicamentos así como una hipoalbuminemia, y por tanto una eventual potenciación de las acciones farmacológicas, con aumento del transporte de fármacos de forma libre.

INFLUENCIA DE LOS MEDICAMENTOS SOBRE LA NUTRICIÓN Y EL ESTADO NUTRICIONAL

Una interacción de los medicamentos sobre el aprovechamiento de los alimentos puede resultar en situaciones de malnutrición por mecanismos diversos. Así, los efectos de los medicamentos sobre la utilización de nutrientes pueden ser clasificados en varios tipos de acciones: alteración de la ingesta de alimentos; alteración de la absorción de nutrientes; alteración en la utilización y metabolismo de nutrientes, y alteración en la excreción de nutrientes.

Ingestión de alimentos

Algunos medicamentos pueden modificar el apetito, bien como efecto terapéutico (anorexígenos), o bien como un efecto secundario a su administración. Otros procesos en los que también se altera la ingestión de alimentos son consecuencia de cambios en gusto y olfato, inducidos por algunos fármacos o la radioterapia.

Absorción de nutrientes

Los medicamentos administrados por vía oral presentan relativamente frecuentes interacciones en la absorción de nutrientes que pueden darse a nivel luminal o en la propia mucosa.

Los efectos luminales de los fármacos incluyen la formación de complejos insolubles y cambios en el pH, en la motilidad y secreciones gastrointestinales, así como en la producción de sales biliares, mientras que los efectos mucosales implican daños sobre el tejido o interferencias competitivas a nivel del sistema de transporte.

Metabolismo de nutrientes

Los principios activos de algunos fármacos persiguen interferir el metabolismo celular inhibiendo algunas reacciones celulares (antineoplásicos), mientras que en otros casos estas interferencias son consecuencia de efectos secundarios.

Entre las interacciones descritas acerca de la influencia de medicamentos sobre el metabolismo de nutrientes se incluyen ciertas antivitaminas y antimetabolitos e inductores o inhibidores enzimáticos, que afectan el aprovechamiento nutritivo de los mismos por el organismo (antinutrientes), así como la inhibición de la síntesis de algunos nutrientes a nivel de flora intestinal (antibióticos), con lo que aumentan las necesidades.

Excreción de nutrientes

La excreción de determinados nutrientes puede estar alterada por la administración de determinados fármacos a través de diferentes mecanismos, como el desplazamiento de minerales y vitaminas de sus proteínas transportadoras, fenómenos competitivos a nivel de la reabsorción tubular o formación de complejos químicos. En determinadas situaciones, la excesiva pérdida o retención de nutrientes puede ocasionar cuadros específicos de depleción (hipocalcemia, hipokalemia, etc.) o de toxicidad (hiperkalemia, hipermagnesemia, etc.).

PREDICCIÓN DE INTERACCIONES FÁRMACOS-NUTRIENTES: ASPECTOS PRÁCTICOS

Las variables que deben considerarse en el estudio de posibles interacciones entre fármacos y nutrientes son: la prescripción farmacológica, el régimen dietético y la situación fisiopatológica del enfermo. Por tanto, la prevención y la evaluación del riesgo de interacciones comprende el conocimiento de la historia dietética y la historia clínica de pacientes, incluyendo los tratamientos farmacológicos previos y actuales.

Las pautas prácticas para evitar las interacciones entre fármacos y nutrientes son las siguientes:

- Seleccionar la posología de administración y pautas del fármaco de acuerdo a los conocimientos actuales y vigentes.
- Mantener los hábitos alimentarios de forma estable a lo largo del tratamiento farmacológico.
- Informar de posibles efectos no deseables, erráticos o la falta de efecto farmacológico del tratamiento.
- Informar de posibles efectos sobre el estado nutricional.

En este sentido, el médico, la enfermera, el dietista y el farmacéutico comparten una responsabilidad conjunta en la predicción y control de riesgos de las posibles interacciones entre fármacos y nutrientes (Tablas 8-1 y 8-2).



INTERACCIONES FÁRMACOS-NUTRIENTES

Las interacciones entre fármacos y nutrientes son el resultado de influencias fisicoquímicas, fisiológicas y fisiopatológicas cuya significación clínica puede afectar tanto a la modificación en la respuesta farmacológica como a la utilización nutritiva a través de cambios en la biodisponibilidad, metabolismo y excreción del fármaco o de los nutrientes respectivamente.

El riesgo de interacciones fármacos-nutrientes depende de las características del fármaco, de la dieta y del paciente, y su prevención requiere un adecuado conocimiento de las listas de interacciones y un trabajo conjunto de diferentes profesionales de la salud.

Tabla 8-1. FÁRMACOS QUE AFECTAN A LA UTILIZACIÓN DE NUTRIENTES

INTERACCIONES FÁRMACOS-NUTRIENTES	NUTRIENTES																							
	Fármacos	H. de C.	Lípidos	Proteínas	Na	K	Ca	P	Mg	Fe	Zn	Cu	Vit. B ₁	Vit. B ₂	Vit. PP	Vit. B ₆	Folatos	Vit. B ₁₂	Vit. C	Vit. A	Vit. D	Vit. E	Vit. K	
Analgésicos	X	X	X	X	X	X		X		X	X							X	X					
Antiácidos							X		X				X							X				
Antibióticos	X	X	X		X	X		X	X	X				X		X	X	X	X	X		X	X	
Anticoagulantes																								X
Anticonceptivos orales								X	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	X		
Anticonvulsivantes						X		X					X			X	X	X	X		X			
Antidepresivos	X					X		X																
Antidiabéticos orales	X	X	X			X											X	X						
Antifúngicos					X			X																
Antineoplásicos	X	X	X													X	X							
Antisépticos urinarios																	X							
Antituberculosos	X	X		X			X		X						X	X	X	X						
Cardio-fármacos	X				X	X		X																
Corticosteroides	X	X	X		X	X	X				X					X	X		X		X			
Diuréticos	X			X	X	X		X		X			X	X			X							
Hipocolesterolemiantes	X	X				X		X									X	X		X	X	X	X	
Hipotensores	X															X		X						
Hipouricemiantes				X	X	X	X	X	X					X										
Laxantes	X	X			X	X	X													X	X	X	X	
L-Dopa				X	X											X			X					
Parasimpaticolíticos									X															
Sedantes/Hipnóticos																						X		
Sulfonamidas								X									X		X					
Tranquilizantes: Clorpromacina		X	X																					

Tabla 8-2. EFECTO DE DIVERSOS ALIMENTOS SOBRE LA ACCIÓN FARMACOLÓGICA

INTERACCIONES FÁRMACO-NUTRIENTES		INTERACCIONES FARMACOCINÉTICAS			INTERACCIONES FARMACODINÁMICAS
Alimento	Fármaco	Absorción	Metabolización	Eliminación	Agonismo/Antagonismo
Alimentos (en general)	Tranquilizantes	+r			
	Levodopa	-			
	Analgésicos	-r			
	Cardio-fármacos	+r			
	Cimetidina	r			
	Hidrocortisona	r			
	Diuréticos	+r			
	Nitrofurantoina	+			
Antibióticos	-				
Café y Té	Neurolépticos	-			
Fibra: Salvado, HdC	Digoxina	-			
	Paracetamol				
Harina rica en grasas	Griseofulvina	+			
Dieta rica en proteínas	Levo y Metildopa	-			
Leche y lácteos	Tetraciclinas	-			
Harina lacteada	Metotrexato	-			
Zumos cítricos	Quinidina			-	
Alimentos salados	Sales de Litio			+/-	
Verduras hervidas	Anticoagulantes				Agonismo
Brócoli, nabo, lechuga	Anticoagulantes				Agonismo
Regaliz	Antihipertensivos				Antagonismo
	Digoxina				Agonismo

+; aumentada; -; inhibida; r; retardada.

Investigación en nutrición: métodos para el estudio de la utilización y funciones de los nutrientes

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

1. Identificar aspectos críticos y factores implicados en la investigación nutricional.
2. Seleccionar métodos y técnicas, así como modelos animales para determinar la utilización de nutrientes y sus funciones.
3. Definir indicadores y marcadores de la ingesta dietética y el metabolismo en estudios con humanos.

INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS NUTRICIONAL

La investigación científica orientada a la nutrición tiene como objetivo comprender los procesos implicados en el equilibrio entre el aporte y los requerimientos de sustratos que garanticen la integridad funcional del organismo, incluyendo la homeostasis, crecimiento y reproducción. El análisis es la base más extendida para la evaluación nutricional de alimentos y bebidas, los cuales no sólo están compuestos por nutrientes esenciales (hidratos de carbono, lípidos, proteínas, minerales, vitaminas y agua) que contribuyen al mantenimiento de la vida, sino también por factores antinutricionales (fitatos, lecitinas, antiproteasas,...) así como otros compuestos con propiedades saludables (alimentos funcionales) y con funciones no nutricionales (compuestos volátiles, contaminantes, aditivos,...) con influencia sobre aspectos organolépticos. En la actualidad hay disponibles muchos tipos de análisis para estimar la composición de los alimentos mediante métodos químicos, microbiológicos y biológicos. Los ensayos químicos se basan en algunas de las propiedades físicoquímicas de los constituyentes de los alimentos. Una aproximación inicial puede ser el análisis Weende, por el que se pueden determinar de forma indirecta los lípidos (extractos con éter), los minerales (cenizas), proteínas (nitrógeno 6,25) y la fibra total, en muestras del extracto seco del alimento, mientras que la di-

ferencia de peso entre el alimento en origen y la muestra seca es una estimación de los carbohidratos solubles o el extracto libre de nitrógeno.

Los datos obtenidos a través de procedimientos químicos, biológicos o microbiológicos se utilizan en la preparación de tablas de composición de alimentos para distintas aplicaciones. Una buena tabla de composición de alimentos debería contener información sobre un elevado número de alimentos y nutrientes, pero conviene también que tengan información sobre métodos, calidad de los datos y muestreo, biodisponibilidad, unidades de expresión de los nutrientes y estimaciones indirectas, etcétera.

TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN NUTRICIONAL



Los procesos involucrados en la utilización de nutrientes, tales como la digestión, absorción, metabolismo y excreción, así como las funciones de los nutrientes, se pueden evaluar y medir mediante el uso de estrategias *in vitro* e *in vivo*.

- Técnicas *in vitro*: útiles para la investigación en la utilización de nutrientes y en los efectos de nutrientes y metabolitos sobre las funciones específicas de sistemas biológicos o tejidos.
- Técnicas *in vivo*: comprenden dos grandes bloques, la investigación en modelos animales y la investigación en humanos. Los resultados obtenidos en la investigación con técnicas *in vivo* son, en ocasiones, de mayor utilidad, pero su principal limitación es el elevado coste y la dificultad para relacionar los resultados obtenidos con un único mecanismo o proceso.
- *In situ*.
- *In silico*.

TÉCNICAS *IN VITRO*

Los resultados biológicos se pueden predecir, en algunas ocasiones, mediante procedimientos *in vitro*, cuyas principales ventajas son el evitar el sacrificio de animales, y el ahorro de tiempo, espacio y costes. Estos métodos implican la reproducción en laboratorio de la función *in vivo*. Una limitación de las determinaciones *in vitro* es que son relativamente poco "fisiológicas" y los valores obtenidos son por lo general más bajos que los que se obtienen en las condiciones de análisis *in vivo*, lo cual se ha achacado principalmente a las con-

diciones de aporte de oxígeno y sustratos. Sin embargo, a pesar de la existencia de problemas potenciales asociados a la determinación *in vitro* de la utilización de nutrientes, se ha obtenido un gran número de datos y conclusiones determinantes en lo relativo a las funciones de nutrientes y sus mecanismos reguladores, proporcionando, en determinados casos, conocer aspectos aislados, sin interferencias, de distintos tipos de células y otros factores.

En este contexto, la disponibilidad de un determinado nutriente se ha definido como la cantidad o el porcentaje de nutriente en el alimento que se utiliza metabólicamente por el organismo para las funciones de crecimiento o mantenimiento. La aplicación de procesos enzimáticos de digestión *in vitro*, a pesar de presentar algunas restricciones, ha proporcionado información útil sobre la disponibilidad de macronutrientes y fibra dietética mediante el empleo de tratamientos ácidos y alcalinos, o a través de diferentes proteasas, lipasas y amilasas. Uno de los experimentos *in vitro* clásicos para examinar el papel de los jugos gástricos sobre la digestibilidad de los carbohidratos se realiza mediante el uso de saliva como fuente de enzimas. Igualmente, existen métodos para determinar la digestibilidad real de proteínas ileales y aminoácidos, que se complementan con técnicas en bolsa móvil de nailon. Las actividades de las peptidasas específicas, las disacaridasas y las lipasas se han cuantificado también aplicando raspados de mucosa junto con sustratos adecuados.

La publicación de métodos simples y precisos para el análisis de aminoácidos ha permitido que se desarrollen protocolos fiables que permiten predecir la calidad de la proteína y su utilización. Estos procedimientos, basados en los análisis químicos de los aminoácidos esenciales en los alimentos, han proporcionado resultados bien correlacionados con los valores biológicos. Por tanto, la puntuación química permite juzgar la adecuación nutricional y la utilización de alimentos por comparación de su composición en aminoácidos con la composición de un alimento de referencia (generalmente la proteína total del huevo). Algunos métodos clásicos de análisis químico para la evaluación de la calidad de la proteína se basan en la determinación de nitrógeno, tests de solubilidad de proteínas, ensayos microbiológicos, etc. Otros procedimientos *in vitro* se basan en la determinación de la absorción de nutrientes

a través de preparados de intestino evertido, anillos intestinales, cámaras de Using o enterocitos aislados, métodos que se han empleado con éxito para la determinación del transporte de azúcares, aminoácidos, minerales y vitaminas, y con algo más de incertidumbre para la evaluación del transporte de materias lipófilas.

El estudio del destino y metabolismo de nutrientes también se ha beneficiado del desarrollo de elegantes aproximaciones *in vitro*, las cuales han proporcionado información sobre el ciclo de la glucosa, los lípidos, los compuestos nitrogenados, los minerales, las vitaminas y el agua, así como del metabolismo energético en diferentes células y órganos, a través de marcadores y trazadores apropiados (compuestos marcados, cambios enzimáticos,...). Por tanto, la cinética de diversos procesos metabólicos (glicólisis, gluconeogénesis, síntesis y degradación de proteínas, lipólisis y lipogénesis, etc.) se ha evaluado bajo diferentes condiciones fisiológicas y nutricionales en hígado, músculo, células rojas, etc. La utilización de marcadores radioactivos, métodos de doble marcaje y técnicas de microinyección, así como los protocolos de liberación de nutrientes no isotópicos, ha proporcionado información valiosa sobre los ciclos de nutrientes y sus funciones. Como ejemplo, las preparaciones celulares, como las de adipositos aislados, han permitido demostrar el papel de nutrientes específicos en la lipólisis y lipogénesis, mientras que la participación de precursores de glucosa como el lactato en la gluconeogénesis se ha investigado en hepatocitos aislados. La disponibilidad de células como los preadipocitos 3T3-L1, células Caco-2 obtenidas de preparados de cáncer de colon, líneas celulares del hepatoblastoma humano HepG2, etc., ha facilitado la reproducibilidad de numerosos estudios relativos al metabolismo y las funciones de los nutrientes. También el empleo de fracciones subcelulares (mitocondrias, etc.) puede resultar de utilidad.

Además, la estimación de la síntesis y degradación de macronutrientes se ha conseguido llevar a cabo por los investigadores gracias a la aplicación de una gran variedad de estrategias, incluyendo los tejidos perfundidos, la incubación de tejidos intactos, cultivos de órganos, sistemas libres de células, etc. Los cambios en la concentración enzimática y las tasas de formación y degradación de enzimas, así como la actividad enzimática de moléculas clave han producido datos valiosos re-

lativos al papel y utilización de los nutrientes a nivel tisular. La mayoría de los estudios han empleado tejidos de rata, aunque para objetivos específicos también se han utilizado muestras biológicas procedentes de otros animales. La diversidad de las preparaciones que se usan permite tener flexibilidad para el análisis *in vitro* de los procesos metabólicos. Además, los efectos de inhibidores específicos, hormonas u otras sustancias se pueden examinar fácilmente junto a los nutrientes en preparaciones *in vitro*. En muchas ocasiones, estos efectos se pueden estudiar utilizando el pareamiento en el diseño del experimento y aplicando un análisis estadístico de muestras pareadas, obteniendo de este modo una mayor eficacia estadística y una mayor fiabilidad en las medidas.

En los ensayos relacionados con la defensa e inmunocompetencia también se utilizan de modo generalizado técnicas *in vitro*, para poder evaluar el grado de implicación de determinados nutrientes en la homeostasis del organismo. Por consiguiente, se ha desarrollado un grupo de pruebas para identificar y cuantificar distintas subclases de linfocitos mediante las técnicas de aislamiento de células del sistema inmunológico. Además, la función linfocitaria, como indicador del papel de los nutrientes, se puede evaluar a través de las respuestas *in vitro* de los linfocitos frente a mitógenos específicos, como la concanavalina A, la fitohemaglutinina, etc., o nutrientes (aminoácidos, ácidos grasos, minerales,...). Un grupo control se debe incluir siempre que sea posible, ya que la respuesta inmune puede estar regulada por factores genéticos.

La microscopía óptica es una herramienta poderosa en los laboratorios actuales. De hecho, el examen visual de un tejido sometido a diversas condiciones nutricionales puede llevar a nuevos descubrimientos en las relaciones estructura-función. Del mismo modo, se aplica habitualmente el marcaje mediante anticuerpos o el marcaje de compuestos específicos. La localización a nivel celular de determinadas proteínas afectadas por la manipulación de nutrientes es otra de las técnicas habitualmente aplicadas. Además de la utilización de la inmunohistoquímica con anticuerpos específicos, las técnicas de hibridación *in situ* de cDNA marcado con el tejido en estudio se pueden usar. Obviamente, estas técnicas pueden aportar información cuantitativa, así como la localización dentro del tejido de la zona donde puede producirse

el cambio de la expresión de los transcritos en función de los cambios nutricionales. La microscopía electrónica permite la observación detallada de organelas celulares como las mitocondrias, que generalmente no son visibles por microscopía óptica. Sin embargo, el número de nutricionistas que emplean estas herramientas es mucho menor.

La implicación de receptores específicos en las funciones nutricionales de la vitamina B₁₂, derivados del retinol, etc., puede estudiarse mediante el uso del método Scatchard, que proporciona información sobre el impacto de la nutrición en el número y la afinidad de receptores. De manera complementaria, la caracterización de mensajeros secundarios y mediadores a nivel citosólico y nuclear es interesante para identificar influencias tanto beneficiosas como deletéreas, así como los mecanismos de nutrientes específicos en aspectos relacionados con la nutrición.

Los ensayos microbiológicos utilizan bacterias y otros microorganismos como material de ensayo, lo cual requiere menos tiempo para realizar que los ensayos biológicos con animales, aunque el elemento que se quiera evaluar debe ser previamente extraído del alimento que lo contiene para luego poder adicionarlo al medio de crecimiento. Algunos ensayos microbiológicos se han utilizado para evaluar, en unidades internacionales, el contenido en vitaminas de alimentos, como por ejemplo el *Lactobacillus viridescens* o fermenti (tiamina), *Lactobacillus casei* (ácido fólico y riboflavina), *Streptococcus zymogenes* (riboflavina), *Lactobacillus plantarum* (ácido nicotínico, biotina y ácido pantoténico), *Saccharomyces calshbergensis* (vitamina B₆ y ácido pantoténico) y *Lactobacillus leichmanni* (vitamina B₁₂). Los hongos, protozoos y levaduras también se han utilizado como herramientas analíticas, al igual que productos de los microorganismos (enzimas). También están disponibles numerosas técnicas inmunoquímicas para la identificación y cuantificación de constituyentes alimentarios específicos.

La aplicación de técnicas de biología molecular en sistemas de cultivos celulares y tisulares ha proporcionado a los investigadores unas poderosas estrategias para evaluar y establecer las rutas metabólicas y el papel regulador de los componentes nutritivos y no nutritivos de los alimentos. Por tanto, el uso de la inmunoprecipitación Northern, Southern y Western para cuantificar RNA, DNA y proteínas específicos en los tejidos como

respuesta al aporte de nutrientes, son una herramienta habitual en laboratorios de nutrición. La influencia de algunos nutrientes o de las condiciones nutricionales sobre la dinámica ribosómica, así como en procesos de hiperplasia e hipertrofia celular han sido estimados a través de valores de RNA, DNA o del ratio proteína/DNA, respectivamente.

Los sistemas subcelulares como las mitocondrias, los lisosomas, el núcleo, etc., se han seleccionado específicamente para caracterizar las funciones individuales de diferentes minerales, vitaminas y otros nutrientes (ácidos grasos, aminoácidos, etc.), dado que algunos componentes y señales dietéticas pueden controlar la expresión de proteínas a través de determinados procesos transcripcionales y postranscripcionales. Por ejemplo, los ácidos grasos, el ácido retinoico y el colecalciferol tienen receptores nucleares específicos. Como respuesta a la activación del ligando, los receptores interactúan con secuencias específicas de reconocimiento del DNA de un gen en particular, provocando la estimulación o inhibición de la tasa de transcripción de dicho gen. Datos recientes sugieren también que los hidratos de carbono y



BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA INVESTIGACIÓN NUTRICIONAL

El enfoque de la biología molecular ha permitido numerosos descubrimientos *in vitro* que implican funciones de los nutrientes *in vivo* a nivel genético. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR en inglés) permite la amplificación de DNA mediante termocicladores y los estudios de transfección implican la inserción de DNA en células para examinar las funciones y el metabolismo de los nutrientes. De hecho, líneas celulares específicas que no pueden expresar un gen en particular pueden ser transfectadas con DNA conteniendo el promotor de dicho gen o incluso el propio gen, para poder estudiar las interacciones de diversos nutrientes sobre la expresión de ese gen en concreto. En cualquier caso, la función de los nutrientes a nivel celular y genético debe ser más estudiado y proporcionar resultados en profundidad. La regulación genética a través de la Nutrición se ha comprobado en diferentes tejidos y células aislados, utilizando los indicadores y marcadores más apropiados para los niveles de expresión genética del RNA, cuya información puede multiplicarse a través de "microarrays" *in vivo*.

los ácidos grasos poliinsaturados pueden regular el contenido citosólico de transcritos específicos mediante la regulación de algunos de los procesos implicados en la maduración del RNA mensajero. Otro ejemplo sería la traducción del mRNA de la ferritina y la estabilidad del mRNA del receptor de la transferrina, cuya regulación se ha demostrado recientemente condicionada por la concentración de hierro en el citosol. De un modo similar, otras áreas de la investigación molecular frecuentemente aplicadas por los investigadores nutricionales son la medida de la abundancia de mRNA, la caracterización de factores de transcripción nuclear y el reconocimiento de secuencias específicas de DNA y polimorfismos implicados en la etiología de enfermedades nutricionales.

MODELOS ANIMALES EN INVESTIGACIÓN NUTRICIONAL

Los animales se emplean como proveedores de productos biológicos como hormonas, anticuerpos, etc., pero también existen modelos para el estudio de respuestas y procesos biológicos relacionados con la nutrición. Por tanto, diversos sistemas animales se han empleado para medir la utilización y el destino de los nutrientes además de investigar las funciones de los nutrientes. Por consiguiente, una parte de nuestros conocimientos en relación a la nutrición derivan de la experimentación animal, que son frecuentemente extrapolados al hombre. Por tanto, en numerosas ocasiones el animal sirve como sustituto del hombre y se refiere al mismo como **modelo animal**.

La significación de los resultados derivados de los experimentos con animales depende de la selección de un modelo animal adecuado, los cuales se han categorizado en cuatro grupos: modelos animales individuales (por ejemplo, administración o ausencia de un nutriente); modelos animales espontáneos (por ejemplo, modelos genéticos de intolerancia de nutrientes); modelos negativos (por ejemplo, animales insensibles a la carencia de vitaminas como la vitamina C); y modelos huérfanos (por ejemplo, animales con un genotipo específico homólogo al presente en humanos). En cualquier caso, la extrapolación de datos desde los animales a los humanos debería realizarse siempre con prudencia, al igual que debería llevarse a cabo la selección de animales basándose en considera-

ciones éticas, científicas y prácticas. La variabilidad intrínseca en las respuestas de los animales se puede reducir utilizando cepas isogénicas, selección genética, y seleccionando animales específicamente libres de algún patógeno, así como realizar un control ambiental y nutricional, seleccionar una muestra uniforme, aclimatar a los animales, selección imparcial y muestreo apropiado.



ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN ANIMAL

El uso de animales se debe realizar siguiendo las regulaciones apropiadas para experimentación animal que estén en vigor, según la legislación local, nacional o internacional (Acta de crueldad hacia los animales, Acta de bienestar animal, Guías para la experimentación animal, Directivas europeas, etc.), las cuales implican la existencia de instalaciones adecuadas, alojamiento y cuidados dignos, alternativas a procedimientos de anestesia y eutanasia de los animales, registro, abastecimiento de animales y regulación por parte de Comités de Ética de Investigación.

Las ratas al destete o las sexualmente maduras de diferentes cepas son los modelos animales más utilizados, aunque también se han alimentado ratones, pollos, cerdos de guinea, perros, ovejas, cerdos, truchas, bueyes o primates, entre otras especies, con fines de investigación nutricional en todo el mundo. La selección de animales específicos para utilizar en ensayos depende de la disponibilidad de especies, la facilidad para alimentarlas en condiciones de cautividad, la facilidad de mantenimiento, si se ha utilizado previamente para estudios similares y la posibilidad de extrapolar los resultados a otras especies.

La composición del alimento o el contenido en nutrientes del mismo se determina mediante la respuesta de los animales a su ingesta en relación al peso corporal, crecimiento de órganos y tejidos o/y otros criterios particulares como la prevención o tratamiento de determinados síntomas, el nivel de nutrientes específicos en sangre u orina, etc. La utilidad de los ensayos con animales está limitada debido al elevado coste, trabajo y tiempo, aunque la principal ventaja es que proporcionan pruebas reales sobre la existencia de respuestas biológicas. En el diseño y desarrollo de estudios con alimentos en modelos animales, es importante asegurarse

de que las condiciones experimentales son idénticas para todos los animales. Por tanto, el equilibrio endocrino, maduración, edad y el estado nutricional previo se deberían tomar en consideración además de realizar el muestreo aleatoriamente, establecer criterios de tamaño muestral y conocer las características del modelo animal.

La ingesta de alimentos es otra de las informaciones que se pueden obtener a partir de los ensayos con animales, lo cual puede contribuir a explicar distintos resultados realizados en diferentes condiciones experimentales. El balance metabólico es el resultado de la ingesta menos el rendimiento, y refleja la cantidad de un determinado nutriente retenido por el organismo, pero también refleja posibles cambios en la composición corporal, los cuales pueden ser valorados mediante métodos químicos directos o a través de métodos indirectos (por ejemplo, la conductividad eléctrica o energética).

En los estudios nutricionales, las dietas de los animales de laboratorio se clasifican, en función del grado de refinado de los ingredientes, como dietas naturales (formuladas con maíz, legumbres y vegetales, pescado, etc.), dietas químicas (sólo con productos químicos) y dietas purificadas (combinando ingredientes naturales, productos químicos y nutrientes refinados). Las variaciones en la composición de la dieta son a menudo la clave para el diseño de experimentos nutricionales. En este contexto, se pueden aplicar distintos regímenes de alimentación a los animales de laboratorio siguiendo criterios científicos: *ad libitum*, donde los animales tienen libre acceso a la comida, o alimentación controlada, donde los animales pueden comer una cantidad limitada de comida (alimentación restringida) o donde los animales reciben tanta comida como pueden comer (alimentación forzada). Un forma específica de alimentación restringida es la alimentación pareada (*pair-fed*), en la que se mide la ingesta de unos animales control para igualar la ingesta del grupo de experimentación al día siguiente. La ingesta o el abastecimiento de nutrientes se puede realizar de forma oral, intravenosa, intraperitoneal o mediante herramientas específicas (sondaje, estereotaxis, etc.). Del mismo modo, la alimentación específica con una selección de alimentos o ingredientes, pueden llevar a la obtención de modelos específicos inducidos por la dieta de obesidad (dietas de cafetería) o hipercolesterolemia (dietas ricas en grasas saturadas,...).

Los ensayos de digestibilidad en experimentos animales pretenden evaluar la porción de alimento o de nutriente consumido que no es excretado a través de las heces y que se asume que ha sido digerido por el animal. En este contexto, la digestibilidad aparente de un macronutriente se puede calcular del siguiente modo:

$$\left[\frac{\text{macronutriente}_{\text{alimento}} - \text{macronutriente}_{\text{heces}}}{\text{macronutriente}_{\text{alimento}}} \right] \times 100$$

La digestibilidad real, sin embargo, toma en consideración las sustancias secretadas en el intestino y que no se reabsorben, y se estima de este modo:

$$\frac{\text{macronutriente}_{\text{alimento}} - (\text{macronutriente}_{\text{alimento}} - \text{macronutriente}_{\text{secretado}} \times 100)}{\text{macronutriente}_{\text{alimento}}}$$

En un ensayo de digestibilidad, una medida precisa de la ingesta de alimento y de la eliminación por heces/orina es muy importante. Para este tipo de ensayos, los animales se deben instalar en jaulas metabólicas o en otros artilugios que aseguren la validez del ensayo. Para experimentos llevados a cabo con aves, la determinación de la digestibilidad es complicada dado que la excreción de orina y heces es simultánea. En algunas circunstancias, debido a la falta de equipamiento adecuado o a la naturaleza del ensayo, se pueden utilizar marcadores no digeribles.

El crecimiento y la composición corporal también se emplean con frecuencia como criterios para la evaluación de la utilización de nutrientes. Una curva de crecimiento se representa interpolando los cambios en el peso corporal frente al tiempo, aportando información sobre el resultado general de una exposición nutricional, la cual se puede complementar mediante la estimación de las tasas medias absoluta y relativa de crecimiento, equivalencias en crecimiento según la edad, etc. Actualmente se dispone de equipos de densitometría (DXA) y resonancia magnética nuclear (RMN) para evaluar la composición corporal de pequeños animales.

Otras aproximaciones buscan principalmente establecer los cambios en el contenido de nutrientes en el organismo de los animales como respuesta a una dieta o una comida que contiene el nutriente o el alimento estudiado. Mientras que los niveles de nutrientes en los cuerpos de los anima-

les sacrificados se pueden medir de forma directa, prácticamente todas las medidas de los niveles de nutrientes en animales vivos dependen en gran manera de métodos indirectos. Existen básicamente dos aproximaciones para la estimación de los cambios en el contenido de nutrientes en animales vivos. La primera aproximación implica la medida de los cambios de peso (ganancia o pérdida), directa e indirecta, producidos en el animal. Los ensayos realizados en animales enteros, basándose en esta aproximación, para el análisis de la proteína dietética y la energía incluyen el ratio de eficacia de la proteína (PER, en inglés), ratio de proteína neta (NPR) y ensayos multinivel como los ensayos de razón de la pendiente y energía neta (NE, en inglés). La segunda aproximación para la estimación de los cambios en el contenido de nutrientes del cuerpo implica medidas de la ingesta y salida de nutrientes del cuerpo a través de los estudios de balance. Los ensayos con animales basados en esta aproximación para el análisis del metabolismo proteico y energético incluyen los balances de nitrógeno y de energía, el valor biológico (BV, en inglés), utilización neta de la proteína (NPU) y energía neta (NE).

Otras estrategias, conocidas como ensayos de depleción-repleción se basan en la inducción de una deficiencia, la cual es seguida por la monitorización de la recuperación de niveles basales. Otra medida del valor energético de un alimento es la energía metabolizable, que corresponde a la energía digerible de una comida menos la energía de esa comida que se ha perdido a través de la orina y los gases combustibles.

La sangre total o una fracción de la misma (leucocitos, eritrocitos, etc.) son materiales de biopsia para la evaluación nutricional que se emplean habitualmente para estimar los niveles de un nutriente o sus metabolitos, aunque otros fluidos como la orina, saliva y el líquido amniótico, u otras muestras, como el pelo, piel, uñas, mucosas, etc., también se pueden analizar. Los análisis de laboratorio de estas muestras pueden aportar información específica y valiosa sobre la utilización y funciones de los nutrientes. Un procedimiento alternativo consiste en analizar la tasa de excreción urinaria, que refleja el contenido del cuerpo o el tamaño del tejido de almacenamiento. La excreción urinaria de algunos aminoácidos como la 3-metilhistidina o la hidroxiprolina son indicadores de la degradación de proteínas miofi-

brilares o de la degradación de colágeno, respectivamente.

Algunos exámenes funcionales informan sobre el impacto de la nutrición global para que las células, tejidos y órganos puedan realizar las funciones biológicas dependientes de nutrientes específicos. Los niveles plasmáticos de minerales, vitaminas y sus metabolitos suelen ser buenos indicadores de la ingesta de nutrientes, así como la excreción urinaria de los mismos. Además, los niveles circulantes de hemoglobina, el hematocrito, las proteínas plasmáticas, insulina, glucosa, cuerpos cetónicos y otras moléculas presentes pueden contribuir a obtener información sobre el destino de un determinado nutriente. Otros análisis conllevan el análisis de la producción anormal de metabolitos o los cambios en la actividad de determinadas enzimas y componentes de la sangre dependientes en un nutriente específico. Estos ensayos pueden medir funciones fisiológicas que se ven afectadas por nutrientes específicos y que contribuyen al conocimiento cualitativo y cuantitativo de rutas metabólicas específicas. Algunos de los factores que pueden confundir en la interpretación de los análisis de laboratorio son la regulación homeostática, las variaciones diurnas, enfermedades, edad, sexo y la interacción de nutrientes, así como las características del método analítico.

El recambio y el depósito de nutrientes en los animales han sido convenientemente estudiados utilizando marcadores isotópicos que se han administrado en alimentos marcados, y por técnicas de medida de la composición corporal con aparatos simples o más sofisticados (ultrasonidos, bioimpedancia, etc.), mientras que las aproximaciones en inmunocompetencia proporcionan información sobre las propiedades funcionales de algunos nutrientes, principalmente en animales deficientes o deplecionados. Los valores de consumo de oxígeno y producción de CO_2 aportan datos útiles sobre el metabolismo energético (tasa metabólica basal, termogénesis inducida por alimentos, etc.), si se emplea un equipamiento y unas instalaciones adecuadas. Por consiguiente, la oxidación de macronutrientes (grasas, carbohidratos, etc.) se puede evaluar mediante el cálculo del cociente respiratorio ($\text{CR} = \text{consumo de } \text{CO}_2/\text{O}_2$) además de aplicar ecuaciones específicas para el aporte energético de cada sustrato. La temperatura corporal y la medida de disipación de calor

también pueden aportar información valiosa sobre el metabolismo de nutrientes y el estado nutricional en situaciones de infra o sobrealimentación así como del gasto energético.

Las especies de animales modificados genéticamente son cada vez más habituales en la investigación en nutrición. Tanto la presencia de un potente promotor unido a un gen de interés como la delección de un gen determinado mediante el bloqueo de una secuencia de exones, a través de modelos transgénicos ofrecen nuevas perspectivas para el estudio de las funciones de los nutrientes. El modelo transgénico en el que un gen determinado ya no se expresa se conoce como **modelo knock-out**. Por ejemplo, el receptor activado de proliferación de los peroxisomas alfa (PPAR α) no se expresa en un modelo *knock-out* de ratón, produciendo como resultado una acumulación de grasa. Dichos modelos representan un interesante escenario para encontrar respuestas a cuestiones básicas en todo el organismo. Además de modelos *knock-out* o de sobreexpresión de genes del animal completo, es factible crear estos modelos donde el evento genético se produzca de modo aislado, en uno o más órganos.

La selección del examen de laboratorio que debe ser empleado en modelos animales debería tener en cuenta la precisión, exactitud, especificidad analítica y sensibilidad, el valor predictivo y su validez. Todas las técnicas pueden estar sujetas tanto a errores aleatorios como sistemáticos de medida. El personal que va a utilizar estos procedimientos debe ser formado para utilizar técnicas validadas y protocolizadas, las cuales deben estar continuamente monitorizadas mediante procedimientos de calidad apropiados. Los requerimientos dietéticos y las pautas éticas se deberían tener siempre en cuenta.

ESTUDIOS NUTRICIONALES EN HUMANOS

Gran parte de los experimentos nutricionales y la metodología de investigación descrita para modelos animales se puede aplicar en seres humanos. Sin embargo, en determinadas ocasiones se prefieren los estudios con animales por razones prácticas, aunque en otras es necesario llevar a cabo el estudio directamente en humanos, debido a la dificultad en la extrapolación de datos. En ambos casos, se deben seguir y cumplir las regulaciones y pautas éticas adecuadas.

Por tanto, los estudios de digestibilidad y balance de nutrientes deberían realizarse en humanos, para evaluar específicamente la utilización de alimentos y las funciones de los nutrientes. Otras aproximaciones experimentales cuyo objetivo es identificar el destino de los nutrientes y cuantificar la velocidad de diferentes rutas metabólicas se han beneficiado por la creciente aplicación de isótopos estables como marcadores cinéticos en la utilización de nutrientes. La mayoría de los elementos existen en una forma **estable** con una abundancia natural muy baja, como por ejemplo el ^{13}C , ^{15}N , ^2H , ^{18}O , ^{70}Zn , etc., los cuales se pueden utilizar como trazadores cuando se incorporan a ciertas moléculas o sales en alto grado. La ventaja evidente de la utilización de isótopos estables es que los métodos no invasivos son cada vez más requeridos éticamente, y además no producen radiaciones ionizantes, aunque su determinación requiere equipamientos de espectrometría de masas, y numerosos isótopos estables son aún muy caros. Las aplicaciones que ofrecen los isótopos estables se han explotado desde hace poco tiempo en los estudios de los ciclos de nutrientes, composición corporal y metabolismo energético, pero también para estudiar la utilización de vitaminas y minerales. En los últimos años, los métodos de doble marcaje para estimar el gasto energético en humanos han recibido mucha atención como complemento de las medidas de calorimetría directa e indirecta, sobre todo en condiciones de vida libre. También se puede obtener información adicional sobre el gasto energético mediante la monitorización del ritmo cardíaco, cuestionarios validados de actividad física y protocolos de bicarbonato marcado. El uso de unidades metabólicas y un control estricto de indicadores metabólicos es necesario en algunas situaciones experimentales. La medida exacta de la ingesta energética a través de diferentes aproximaciones también es de alto interés en los estudios metabólicos, así como el control del apetito con escalas validadas.

Los datos de ingesta de alimentos se obtienen para numerosos fines, incluyendo la estimación de la adecuación de dietas individualizadas y para grupos de población, y la investigación de las relaciones entre la dieta, la salud y el estado nutricional, así como para la evaluación e implementación de programas nutricionales y otros temas de salud pública.

La estimación de la ingesta dietética conlleva la recogida de información sobre la cantidad de alimentos consumidos y, usando los valores de las tablas de composición de alimentos, el cálculo de la energía y el contenido de nutrientes de dichos alimentos. Por tanto, el consumo dietético de los individuos o grupos, se convierte en ingesta de nutriente mediante bases de datos de alimentos y, en su caso, programas informáticos adecuados. De hecho, en los últimos años se ha desarrollado una serie de programas informáticos para ordenador. El registro preciso y la evaluación de la ingesta dietética es una difícil tarea en la evaluación nutricional, debido a influencias de tipo psicológico (sub o sobreestimación de la ingesta), la memoria de los sujetos y la variabilidad en el contenido de nutriente en un mismo alimento. Los métodos más habituales para la estimación de la ingesta de alimentos son el recuerdo de 24 horas, registro estimado de alimentos, registro de pesada precisa de alimentos, la historia dietética y el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, los cuales tienen diferentes aplicaciones y limitaciones.

Existen numerosos métodos aceptables para la determinación de los requerimientos de nutrientes en función de la edad, el género, el nivel de actividad física y el estado de salud. Las encuestas poblacionales se pueden emplear para evaluar la ingesta de nutrientes y relacionar la prevalencia de síntomas clínicos específicos de deficiencias alimentarias con la ingesta del nutriente estudiado. La determinación de niveles séricos y excreción urinaria de determinados nutrientes, junto con la ingesta dietética pueden resultar útiles para establecer los requerimientos nutricionales, así como la determinación de actividades enzimáticas. Los estudios nutricionales más sofisticados también suelen incluir el estudio de la secreción de nutrientes a través del sudor y el pelo. Los estudios de balances son otra aproximación, en la cual los individuos presentes en la unidad metabólica son alimentados con cantidades graduales de un nutriente en particular. Un balance neutro (cero) o ligeramente positivo puede ser considerado como el requerimiento nutricional óptimo. Sin embargo, el desarrollo de este tipo de estudios es caro y se corre el riesgo de no evaluar la distribución del nutriente entre los diferentes órganos. Los estudios que utilizan voluntarios en condiciones de vida libre son muy útiles, ya que los individuos son capaces de participar en sus actividades habituales

y pueden aportar mayor entendimiento, desde un punto de vista práctico.

El suministro de dietas experimentales a voluntarios seleccionados o a poblaciones en condiciones de vida libre requiere el asesoramiento dietético de personal entrenado. Una dieta normal aporta cantidades suficientes de todos los nutrientes esenciales teniendo en cuenta los requerimientos específicos de la fase del ciclo vital en que se encuentran los voluntarios. Las dietas modificadas se basan en las dietas normales, y están diseñadas para cubrir las necesidades de una determinada situación, lo cual puede implicar cambios en determinados nutrientes, su valor energético, su consistencia y su preparación. Los niveles de nutrientes específicos aportados por una dieta modificada deben ser etiquetados como **altos, bajos, controlados, restringidos o libres** en comparación con una dieta normal. Cuando se debe limitar la cantidad de un nutriente determinado, el contenido de la dieta debe estar perfectamente especificado (por ejemplo, 20 g de proteína y 0,5 g de sodio). Las dietas con fines terapéuticos o de investigación deben ser descritas, siempre que sea posible, en términos cualitativos y cuantitativos que no dejen espacio para la mala interpretación.

El impacto de la ingesta de alimentos sobre la salud y el rendimiento nutricional se determina de forma adecuada a través de marcadores antropométricos, bioquímicos, dietéticos y clínicos del estado nutricional.

Valoración antropométrica y de la composición corporal

La valoración antropométrica y de composición corporal es un elemento importante de la evaluación nutricional, cuyos métodos se han tratado exhaustivamente en el Capítulo 7. La falta de un crecimiento apropiado puede ser un síntoma temprano de nutrición inadecuada. Otras medidas, como la relación altura-peso, circunferencia de cabeza y espesor de la piel reflejan el estado nutricional actual y se utilizan para valorar las reservas energéticas del organismo. La altura y el peso son medidas habituales, pero debido a que su significación e importancia no se aprecian, es habitual que se midan descuidadamente, incorrectamente o de forma inconsistente. Para los niños, la altura y el peso se registran como percentiles, que

reflejan el porcentaje de la población total de niños del mismo sexo y edad que presentan esa misma o inferior medida, así el crecimiento del niño puede ser monitorizado para cada edad mediante las curvas de crecimiento.

Otros indicadores, como la envergadura de los brazos y la circunferencia de la cabeza, reflejan generalmente problemas no nutricionales, más que problemas nutricionales. El espesor de la piel es una medida de la grasa subcutánea que se está empleando cada vez más según aumenta el interés por la valoración de los almacenes de proteína y grasa corporal por parte de los profesionales de la salud. Se puede obtener información antropométrica adicional por la circunferencia del brazo medio superior, la cual, combinada con el pliegue tricipital proporciona una mejor estimación del estado nutricional respecto a la energía y la proteína. También se han desarrollado numerosas fórmulas para determinar la grasa corporal como porcentaje del peso corporal mediante los datos antropométricos. El índice de la altura también se ha empleado para determinar la cantidad de músculo esquelético que existe, el cual es un indicador de las reservas proteicas del organismo, aunque su interpretación se debe realizar con algunas reservas.

La determinación en laboratorio de la composición corporal incluye varios métodos tanto de análisis químico como del cuerpo. La grasa corporal también se puede estimar de modo indirecto mediante el índice Quetelet o por el índice de masa corporal (IMC).

Los procedimientos utilizados para evaluar la antropometría y la composición corporal presentan ciertas limitaciones. Por ello, la selección de cualquier método depende de los objetivos del estudio, el coste, la conveniencia, el equipamiento disponible y la experiencia técnica, así como la salud del sujeto y la precisión y exactitud necesarias.

Los métodos basados en modelos bicompartimentales (por ejemplo, la grasa corporal y la masa libre de grasa) incluyen la medida del agua corporal total, contenido de potasio total, densitometría, conductividad eléctrica total del cuerpo y la impedancia bioeléctrica. Estos métodos no son adecuados para pacientes con privación nutricional crónica, ya que en estos casos las asunciones básicas del modelo bicompartimental no son apropiadas. Estas técnicas incluyen análisis por activación de neutrones para la proteína y los minerales, y dilución isotópica para el agua corporal

total. La grasa corporal se puede calcular restando la proteína, minerales y el agua del peso total de un individuo.

Medidas bioquímicas

Los datos bioquímicos relacionados con el estado nutricional se pueden obtener por análisis del plasma, hematíes, células blancas, orina o tejidos como el hígado, hueso, pelo o uñas, existiendo numerosas técnicas y procedimientos que permiten realizar una evaluación del estado nutricional reflejando tanto la ingesta reciente como la realizada a medio y largo plazo (Tabla 9-1).

La herencia genética probablemente influye en el perfil nutricional bioquímico, el cual también se ve influido por factores dietéticos y ambientales. El nivel de un nutriente en el cuerpo también se ve afectado por el género y la edad del individuo. Por consiguiente, cuando se establecen los valores de referencia para los datos nutricionales bioquímicos se proporcionan valores diferenciados para algunos nutrientes. Sin embargo, en muchas ocasiones no existe un valor definitivo para un análisis bioquímico determinado que diferencie entre una persona con deficiencia para ese nutriente y una persona no deficiente.

La sensibilidad de un análisis a los cambios en el estado de un nutriente en particular es importante, ya que el valor bioquímico para un nutriente puede verse influido por la ingesta o por los niveles corporales de otro nutriente. En resumen, un buen examen bioquímico del estado nutricional debería ser sensible a los cambios nutricionales y verse mínimamente influido por otros factores como el ejercicio, la presencia de infección, estrés físico o emocional, o traumas.

Hay disponible una serie de análisis de función (Tabla 9-2) que determinan la influencia del estado nutricional del individuo sobre el rendimiento fisiológico del organismo. Los datos indicadores de la función inmunológica también se pueden considerar valiosos marcadores de la utilización de nutrientes.

Otros exámenes funcionales del estado nutricional se basan en la integridad estructural (fragilidad capilar y eritrocitaria, herida-curación experimental, peroxidación de lipoproteínas-respiración etano/pentano-); transporte (absorción intestinal,

Tabla 9-1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA EVALUACIÓN NUTRICIONAL

Nutriente	Índice de elección
Vitaminas	
Vitamina A	Retinol plasmático, vitamina A plasmática (principalmente ésteres)
Vitamina D	25-hidroxicolecalciferol y vitamina D en plasma
Vitamina E	Ratio vitamina E/colesterol plasmático
Vitamina K	Tiempo de coagulación y vitamina K en plasma
Vitaminas familia B (general)	Tests de activación de enzimas de hematíes; niveles de vitaminas en plasma, hematíes y orina
Vitaminas familia B (específicas):	
- Tiamina	Niveles de tiamina y de transacetolasa en hematíes
- Riboflavina	Activación de glutatión reductasa eritrocitaria
- Vitamina B ₆	Piridoxil fosfato en plasma, ácido piridóxico en orina y transaminasas en células rojas
- Folatos	Folatos en suero o hematíes
- Vitamina B ₁₂	Vitamina B ₁₂ sérica
Vitamina C	Vitamina C en plasma u orina
Minerales	
Sodio y potasio	Niveles en orina
Calcio y magnesio	Niveles en orina
Hierro	Ferritina sérica, protoporfirina eritrocitaria, saturación de transferrina, hemoglobina, etcétera
Zinc	Zinc plasmático
Cobre	Superóxido dismutasa en hematíes
Manganeso, cromo, etcétera	Niveles en plasma
Flúor y cloro	Niveles en orina
Yodo	Niveles plasmáticos de hormonas tiroideas
Selenio	Niveles en orina, plaquetas, pelo y uñas de los pies. Glutathion peroxidasa eritrocitaria
Azufre	Niveles en orina
Fosfatos	Niveles en orina
Hidratos de carbono	
Glucosa	Niveles en orina y plasma, índice glucémico
Lípidos	
Ácidos grasos	Colesterol ésteres en plasma, fosfolípidos de membranas celulares y tejido adiposo (largo plazo)
Colesterol	Niveles plasmáticos, LDL/HDL colesterol
Proteínas	
Aminoácidos	Niveles de urea en orina, concentración de aminoácidos en plasma y orina

transporte plasma/tejidos); hemostasis (tiempo de protrombina, agregación plaquetaria); reproducción (recuento de espermatozoides); función nerviosa (adaptación a la oscuridad, agudeza olfativa

y gustativa, patrón de sueño); y finalmente hemodinámica y capacidad de rendimiento (desarrollo de tareas y resistencia, volumen de oxígeno acumulado y frecuencia cardíaca).

Tabla 9-2. EJEMPLOS DE ANÁLISIS FUNCIONALES

Análisis	Ejemplos
Medida de productos metabólicos inusuales en sangre y orina debidos a una ingesta inadecuada de nutriente.	Excreción elevada de ácido xanturénico en casos de deficiencia de vitamina B ₆ .
Medida de los cambios en componentes sanguíneos y actividades enzimáticas dependientes de un nutriente específico.	Hemoglobina en sangre total para el estado de hierro; actividad de la glutatión peroxidasa eritrocitaria para el selenio; actividad de la glutatión reductasa eritrocitaria para la riboflavina; transquelotasa eritrocitaria para la tiamina.
Exámenes <i>in vitro</i> de funciones <i>in vivo</i> .	Quimiotaxis leucocitaria para energía proteica y depleción de zinc y hierro; test de la supresión de la uridina para vitamina B ₁₂ y folatos.
Respuestas inducidas y tests de carga <i>in vivo</i> .	Hipersensibilidad retardada para la estimación de la energía de proteínas y el zinc; respuesta dosis-dependiente relativa para vitamina A; test de carga de histidina para el folato; carga de triptófano para la vitamina B ₆ .
Respuestas espontáneas <i>in vivo</i> .	Adaptación a la oscuridad y agudeza gustativa para vitamina A y zinc; función muscular para privación de energía proteica.
Respuestas de desarrollo y crecimiento.	Maduración sexual para el zinc; velocidad de crecimiento para energía proteica, zinc o iodina; capacidad cognitiva para el hierro.

En este contexto, se ha postulado que la cantidad de nutrientes esenciales y no nutrientes en la dieta está relacionado con los indicadores bioquímicos, funcionales y nutricionales del organismo. Sin embargo, el estudio de marcadores bioquímicos como predictores de la ingesta dietética de nutrientes está aún en una fase temprana y en muchos casos requiere una validación adecuada. Por tanto, los procedimientos de estudio utilizados deben ser lo suficientemente sensibles, robustos y libres de fluctuaciones o interferencias como para ser válidos y precisos.

La utilización de materiales de referencia y procedimientos de validación, así como una cuidadosa selección de aspectos relativos a la variación temporal en los índices del estado bioquímico, funcional y clínico, es necesaria para ofrecer datos precisos y fiables. Por otro lado, se deberían reconocer y definir otros factores como el estado fisiológico, la velocidad de transporte intestinal, control de interferencias, etc., además de las variaciones intersujetos, interacciones entre nutrien-

tes, interferencias con no nutrientes y circunstancias fisiopatológicas específicas (embarazo, lactancia, enfermedad,...). Los biomarcadores se obtienen generalmente de muestras fecales, urinarias y sanguíneas, aunque la información predictiva sobre la ingesta de nutrientes también se puede obtener por la leche materna, saliva, biopsias de tejido graso, pelo, uñas, etcétera.

Para la mayoría de minerales, las ingesta a corto plazo suele ser fácilmente predecible a través de los niveles de excreción urinaria, asumiendo que la totalidad de la orina recogida puede ser adecuadamente validada y los factores dietéticos sean razonablemente constantes. Existen pocos casos en los que exista una concordancia perfecta entre la ingesta de vitaminas y los biomarcadores plasmáticos de las mismas, aunque cada vitamina debe considerarse independientemente. En cuanto a los lípidos, los marcadores de ingesta habitual se limitan al análisis de la proporción de ácidos grasos en suero o plasma, además de en las membranas plasmáticas de los adipocitos.

Adicionalmente, existen numerosos factores (ingesta de fibra dietética, consumo de alcohol, tabaquismo) que pueden influir en la captación y el metabolismo de la grasa. La relación entre la ingesta proteica y la excreción urinaria de su marcador (urea o aminoácidos) está más cercana que para prácticamente el resto de nutrientes (excepto quizá para el sodio), asumiendo que el sujeto está equilibrado. Sin embargo, se necesita desarrollar marcadores más baratos para la evaluación de la ingesta de fibra y de energía para poder utilizarlos en estudios epidemiológicos.

Examen clínico

La evaluación clínica consta de una parte de exploración física y de la realización de una historia clínica. Se debe prestar especial atención al estado de piel, pelo, dientes, encías, labios, lengua y ojos, y en el caso de los hombres a los genitales, ya que estas zonas son las que muestran los primeros signos de deficiencias nutricionales. El pelo, la piel y la boca son susceptibles de exploración debido al rápido ciclo celular de los tejidos epiteliales y de la mucosa. Otras manifestaciones tempranas se pueden presentar en el tracto gastrointestinal, como la diarrea producida por cambios en el tracto o la mucosa. Los síntomas clínicos de deficiencia nutricional se deben confirmar siempre con datos bioquímicos y/o dietéticos. Un síntoma clínico puede y suele reflejar la presencia de más de una deficiencia nutricional.

Gracias a la historia clínica se puede evaluar cualquier cambio funcional o del comportamiento en el sistema neuromuscular y cardiovascular que puede no ser evidente para el facultativo, pero que es importante para el paciente o su familia. El examen clínico para la evaluación nutricional de numerosos hospitales incluye en la actualidad la determinación del gasto energético del paciente por medición de oxígeno consumido y producción de CO_2 , además de otras medidas de rutina como la altura, el peso, pliegues, etcétera.

La información sobre la historia clínica se puede obtener a través de un cuestionario que el paciente debe rellenar, o a partir de los registros médicos, y puede ser útil para investigar la etiología de la deficiencia de algún nutriente. Las inconsistencias del examinador pueden ser otra fuente de

error, pero esto puede ser minimizado proporcionando entrenamiento y estableciendo los criterios de diagnóstico. La evaluación de la forma física y la capacidad funcional es otra estrategia utilizada en la evaluación nutricional. De hecho, la capacidad de realizar un trabajo físico depende de la eficacia de los sistemas cardiovascular, respiratorio y neuromuscular, los cuales se ven afectados por la ingesta de nutrientes y los cambios en el peso corporal. La capacidad física se puede estimar por la captación de oxígeno ($\text{VO}_2 \text{ max}$) bajo condiciones de mayor carga de trabajo en una bicicleta estática o en un andador mecánico, o alternatively en condiciones de ejercicio más extremas. La fuerza muscular y otros indicadores del estado nutricional se pueden evaluar mediante manómetros eléctricos y electrónicos, mientras que la función motora se ha analizado utilizando baterías



DERECHOS HUMANOS

Las investigaciones que implican sujetos humanos deben respetar unas pautas éticas que protejan los derechos, la privacidad y el bienestar de los mismos. La **Declaración de Helsinki**, redactada en 1964 por la Asociación Médica Mundial, que ha sido revisada posteriormente en Tokio (1975), Venecia (1983) y Hong Kong (1989), siendo las últimas revisiones las de 1996, 2000 y 2008, aunque no tiene un valor legal, ha sentado las bases para las normas éticas que se han desarrollado en varios países, y sigue sirviendo como pauta ética en la investigación mundial. Un panel institucional local, generalmente conocido como Comité de Ética de Investigación o Comité de Bioética, se encarga de revisar todos los protocolos de los estudios que implican investigación en humanos que se llevan a cabo en su zona, para asegurar que se respeta la conducta ética y para evaluar los potenciales riesgos y beneficios.

Una de las claves entre los principios para la conducta ética es la responsabilidad del investigador para explicar al potencial voluntario la naturaleza del estudio, incluyendo los posibles riesgos e incomodidades que el o ella pueda experimentar. A continuación de la descripción escrita y oral, el voluntario es invitado a participar en el estudio. Si él o ella acepta, debe firmar un consentimiento informado. Todos los comités de ética obligan a garantizar la confidencialidad de todos los datos. Los elementos específicos necesarios que se deben incluir en el consentimiento informado suelen estar designados por cada comité de ética local.

de pruebas motoras como sentadillas, arrancadas, *sprints*, carrera de 50 metros, etcétera.

Otros test de funcionalidad, como la fuerza de presión o la capacidad pulmonar pueden ser componentes útiles en la evaluación nutricional, ya que los cambios en el metabolismo y la función pueden producirse antes de que los cambios en la composición corporal sean detectables mediante la antropometría. La estimulación muscular eléctrica tiene la ventaja de que no depende de un esfuerzo voluntario. Los tests psicométricos también se han utilizado para evaluar el impacto de la nutrición sobre la salud a través de un gran número de procedimientos y exámenes como los tests de inteligencia, habilidades específicas, programas de desarrollo, psicología cognitiva y evaluación neuropsicológica.

La información actitudinal suele ser interesante en encuestas nutricionales. La fiabilidad, validez y estandarización de las pruebas dependen de una serie de factores, los cuales deben ser identificados, para poder obtener datos útiles, a través de entrenamiento personal, desarrollo de estudios piloto, etc. Además, la información psicosocial concerniente a la educación, prácticas religiosas, estatus económico, hábitos tabáquicos u otras

características del estilo de vida pueden resultar de utilidad para comprender las interacciones entre la nutrición y la salud.

Los indicadores nutricionales ideales son aquéllos que demuestran su exactitud en la evaluación nutricional, son predictores precisos de los resultados y pueden ser fácilmente controlados durante la recuperación nutricional. Para aumentar su valor predictivo, se han desarrollado índices multiparamétricos. El índice pronóstico nutricional (PNI) incluye la albúmina sérica, transferrina sérica, pliegue tricéptico, e hipersensibilidad retardada, y parece ser un prometedor elemento predictivo del estado nutricional. Dado que la interpretación de numerosos índices de laboratorio pueden confundirse con los efectos de procesos patológicos, se ha desarrollado una aproximación basada únicamente en la historia clínica y la exploración física. Esta técnica, conocida como **evaluación global subjetiva**, permita obtener una predicción válida y reproducible de la morbilidad en pacientes quirúrgicos. También se han desarrollado algunos minicuestionarios para población específica (ancianos, embarazadas, etc.), conocidos como MNA, MUST, DETERMINE, etc.

Diseño y análisis estadístico en estudios de nutrición

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

1. Definir el concepto y las bases de los estudios científicos.
2. Valorar las cualidades de los análisis utilizados en la investigación.
3. Identificar los tipos de estudios de intervención, así como las ventajas y los puntos críticos de cada uno de ellos.
4. Identificar puntos clave en el diseño de estudios de intervención.
5. Describir y seleccionar los métodos adecuados para la investigación de las relaciones causales en epidemiología nutricional.

INTRODUCCIÓN

La investigación científica es la búsqueda intencionada de conocimientos o soluciones a problemas de carácter científico. La investigación se puede definir como un proceso sistemático, organizado y objetivo. En este contexto, la investigación nutricional engloba todos los avances relacionados, no sólo con las funciones de los nutrientes y la influencia a corto o largo plazo del consumo de alimentos sobre el organismo, sino también a los estudios de composición de alimentos, ingesta dietética y a la utilización de los alimentos y nutrientes por nuestro organismo.

El diseño de cualquier investigación consta de una estructura general:

- Selección del tema de investigación.
- Formulación de la hipótesis y los objetivos.
- Preparación de un protocolo de investigación con los métodos más adecuados explicados detalladamente.
- El desarrollo del estudio bajo las condiciones más controladas que sea posible.
- Interpretación de los resultados.
- Y finalmente, la formulación de una teoría.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVESTIGACIÓN



- **Proceso sistemático:** a partir de la formulación de una hipótesis u objetivo de trabajo, se recogen datos según un plan preestablecido que, una vez analizados e interpretados, modificarán o añadirán nuevos conocimientos a los ya existentes, iniciándose entonces un nuevo ciclo de investigación. La sistemática empleada en una investigación es la del método científico.
- **Proceso organizado:** todos los miembros de un equipo de investigación deben conocer lo que deben hacer durante todo el estudio, aplicando las mismas definiciones y criterios a todos los participantes y actuando de forma idéntica ante cualquier duda. Para conseguirlo, es imprescindible escribir un protocolo de investigación donde se especifiquen todos los detalles relacionados con el estudio.
- **Proceso objetivo:** las conclusiones obtenidas del estudio no se basan en impresiones subjetivas, sino en hechos que se han observado y medido, y que en su interpretación se evita cualquier prejuicio que los responsables del estudio pudieran hacer.

Otros aspectos importantes que se deben tener en cuenta respecto al diseño de un estudio es la adecuada selección de los análisis estadísticos que se van a utilizar y la definición de las implicaciones éticas del estudio.

En este contexto, para la interpretación de la información disponible en investigación se debe considerar el papel del azar y la posible aparición de sesgos y desviaciones de resultados debidos a la selección o a la información, además del efecto que pueden ejercer los factores contundentes o la interacción con factores modificadores del efecto. La asignación aleatoria a los grupos de tratamiento puede facilitar la consecución de una distribución equilibrada entre grupos. Por otro lado, los diseños de estudios cruzados, donde cada individuo es control de sí mismo, presentan ventajas y limitaciones.

Un diseño óptimo de estudio de investigación debe igualmente tener en cuenta el método de muestreo, el tamaño de la muestra estudiada, la potencia estadística del estudio y su duración, además del modelo de investigación (formulación de hipótesis y teorías).

La metodología de investigación se puede clasificar atendiendo a varios aspectos: el objetivo (investigación básica o aplicada), la naturaleza del estudio (descriptivo o analítico), el escenario (trabajo de laboratorio o de campo), el grado de control que ejerce el investigador sobre las variables de exposición del estudio (experimental u observacional), estrategia de la recogida de datos (histórica/retrospectiva o prospectiva), tipo de datos y análisis realizados (estudio cualitativo o cuantitativo). La calidad de las medidas realizadas se definen en función de cuatro cualidades básicas: la validez, exactitud, fiabilidad y precisión.

CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE LAS MEDIDAS



- La **validez** describe el grado en el que la información obtenida a partir de los datos está garantizada cuando se tienen en cuenta los métodos empleados, la representatividad de la muestra estudiada y la naturaleza de la fuente de datos. La validez se puede diferenciar en validez interna (se toman en consideración como válidas las inferencias referidas a la población estudiada) y validez externa (validez de las inferencias encontradas a poblaciones externas a los sujetos estudiados, y que por tanto pueden ser generalizables).
- La **exactitud** es un término empleado en la descripción del grado de aproximación de un valor obtenido al valor real. En general, se estima como la diferencia entre el valor obtenido y el real.
- La **fiabilidad** o reproducibilidad se refiere a la consistencia o repetibilidad de una medida.
- La **precisión** se define como la cualidad de ser nitidamente definido o establecido. De hecho, la precisión viene indicada en ocasiones por el número de dígitos significativos en la medida.

De un modo más estadístico, la precisión se refiere a la reducción en la aparición de errores aleatorios. Esta cualidad puede mejorarse bien por el aumento del tamaño muestral, o bien por el uso de un diseño más eficaz. Por ejemplo, la obtención de un mayor equilibrio en la asignación de sujetos expuestos y controles en grupos, o un mejor pareamiento en estudios de caso-control generalmente ofrecen una precisión más alta sin aumentar el tamaño muestral del estudio.

Tabla 10-1. ESTIMACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

	Condición verdadera o condición presente	Condición falsa o condición ausente
Test +	A	B
Test -	C	D
	Sensibilidad = $A / (A + C)$	Especificidad = $D / (B + D)$

Las medidas de sensibilidad y especificidad están relacionadas con la validez de un dato. La **sensibilidad** se define como la proporción de sujetos que presentan la condición que se estudia que han sido correctamente clasificados como que presentan la condición. La **especificidad** es la proporción de personas sin la condición que han sido correctamente clasificados como libres de esa condición. Es decir, la sensibilidad refleja los verdaderos positivos y la especificidad los verdaderos negativos (Tabla 10-1).

PRESENTACIÓN DE LOS DATOS

La estadística puede tener en la investigación en nutrición un papel descriptivo o inferencial. Los métodos de estadística descriptiva son una herramienta poderosa para resumir o condensar una gran cantidad de datos. Los métodos descriptivos pueden acometerse mediante el cálculo de índices estadísticos (media, mediana, desviación estándar, etc.) o mediante el uso de procesos gráficos, como son los histogramas, gráficas de dispersión, diagramas de cajas, etc. Algunos errores ocurridos durante la recogida de datos se pueden detectar fácilmente mediante representaciones gráficas como el histograma o el diagrama de cajas. Estos dos gráficos son útiles para describir la distribución de una variable cuantitativa. Las variables nominales, tales como el género, y las variables ordinales, como el nivel educativo, se pueden representar de un modo simple mediante proporciones tabuladas en categorías o intervalos. Las variables continuas, como la edad y el peso, se suelen presentar mediante presentaciones estadísticas que describen la frecuencia de distribución. Estos resúmenes estadísticos incluyen

medidas de tendencia central (media y mediana) y medidas de dispersión (varianza, desviación estándar, coeficiente de variación). La desviación estándar es una descripción de las características de la muestra y refleja la dispersión o variación respecto a la media.

PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO: VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS E INTERVALOS DE CONFIANZA

Los métodos estadísticos permiten comparar grupos y estimar los parámetros del efecto, como pueden ser las diferencias o los ratios entre las estimaciones de cada grupo. La probabilidad permite determinar si las diferencias encontradas entre dos grupos pueden ser explicadas por el azar o bien se deben a algún efecto ejercido por los factores en estudio. Este procedimiento se conoce como **verificación de la hipótesis**.

El primer paso que se debe dar en la verificación de la hipótesis es formular la **hipótesis nula**, que suele formularse como la negación de la hipótesis de investigación que el científico está buscando. Por ejemplo, si se pretende demostrar que en la población europea adulta el descenso de actividad física durante el tiempo de ocio ha conllevado una mayor prevalencia de sobrepeso/obesidad, la hipótesis de estudio es que existe una diferencia entre los adultos sedentarios y los activos con respecto al índice de masa corporal. La negación de esta afirmación (que no existe tal diferencia) sería la hipótesis nula.

En un segundo paso, hay que calcular la probabilidad de que se hubieran obtenido estos datos, o datos aún más extremos, si la hipótesis nula fuera cierta en la población de la que se han obtenido los participantes. Esta probabilidad se suele denominar **valor p** , cuyo valor máximo es 1 y el mínimo es 0.

VALOR p → PROBABILIDAD CONDICIONAL



El valor p es el nivel de confianza que tenemos en que los resultados obtenidos NO se deben al azar, es decir, si $p < 0,05$, significa que existe menos del 5% de probabilidades de que las diferencias obtenidas se deban al azar.

La condición es que la hipótesis nula sea cierta en la población de la que salió nuestra muestra de estudio. En cualquier caso, el valor p no expresa la probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta, error que se comete demasiado frecuentemente en la interpretación de los valores p .

La verificación de la hipótesis ayuda a decidir si la hipótesis nula debe ser o no descartada. Un valor bajo de p indica que los datos obtenidos no son compatibles con la hipótesis nula. Un valor de p más alto indicaría, por tanto, que los datos son compatibles con la hipótesis nula. Un test de significación de dos colas (bilateral) evalúa las diferencias en dos direcciones respecto de la hipótesis nula (igualdad de medias), mientras que un test unilateral o de una cola sólo es sensible a las diferencias encontradas en una dirección.

Numerosos autores aceptan que un valor de p inferior a 0,05 aporta suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula. El uso de este punto de corte para p significa que el análisis se está utilizando como proceso de toma de decisiones, pero cuando se realiza esta decisión, existe la posibilidad de cometer dos tipos de errores (Tabla 10-2). El error de tipo 1 se define por rechazar la hipótesis nula cuando ésta es en realidad verdadera. Este tipo de error se produce cuando se obtiene un resultado significativo en la muestra de estudio mientras que la hipótesis nula es cierta en la población general. Por otro lado, el error de tipo 2 se produce al obtener un resultado no significativo y por tanto se acepta la hipótesis nula cuando en realidad no es cierta. Las probabilidades de cometer un error de tipo 1 o de tipo 2 se denominan α y β respectivamente.

El poder de un estudio es la probabilidad de obtener un resultado estadísticamente significati-

vo cuando existe un verdadero efecto de un determinado tamaño. El poder de un estudio no es un único valor, sino un intervalo de valores, que dependerá de la magnitud del efecto específico. Cuando se realiza de modo gráfico la comparación entre el poder estadístico y el tamaño del efecto se conoce como **curva de poder estadístico**. El cálculo del tamaño muestral se basa en los principios de verificación de la hipótesis. Por consiguiente, el poder estadístico de un estudio para detectar un efecto de una magnitud específica es complementario al valor de beta ($1 - \beta$). Cuanto más pequeño sea un estudio, más pequeño será su poder. El cálculo del tamaño muestral necesario se percibe habitualmente como una tarea difícil, pero es un hecho importante, ya que se necesita una relativa certeza de que el estudio será lo suficientemente amplio como para proporcionar una respuesta precisa, antes de comenzar con la recogida de datos.

La muestra necesaria para un estudio se puede estimar teniendo en cuenta tres datos:

- La proporción esperada en cada grupo de estudio y, consecuentemente, la magnitud esperada del efecto real.
- El error beta (o alternativamente el poder estadístico) que aceptamos que tenga el estudio.
- El error alfa.

El tamaño muestral mínimo necesario se definiría, por tanto, como un subgrupo de la población sobre la cual se quiere confirmar una hipótesis, que tendrá un tamaño suficiente como para descartar con un grado de certeza suficiente que las diferencias encontradas se deban al azar.

Tabla 10-2. DECISIONES CORRECTAS Y ERRÓNEAS EN LA VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS

		Realidad (población)	
		Hipótesis nula	Hipótesis alternativa
Decisión	Hipótesis nula	Decisión correcta (probabilidad = $1 - \alpha$)	Error de tipo 2 (probabilidad = β)
	Hipótesis alternativa	Error de tipo 1 (probabilidad = α)	Decisión correcta (poder estadístico = $1 - \beta$)

El valor p ha sido objeto de abundante crítica, ya que un valor de p inferior a 0,05 se ha utilizado mal frecuente y arbitrariamente para diferenciar un efecto real de una falta de efecto. Hasta la década de los setenta la principal aplicación de la Estadística en Nutrición y Epidemiología nutricional se centraba en los habituales tests de significación, tomando decisiones sobre si el azar podía o no explicar los efectos observados. Sin embargo, la estimación de la magnitud de asociación causa-efecto es más importante que la decisión simple, ya que la estimación incluye la evaluación del intervalo de valores válidos para la asociación. Esto puede expresarse de un modo más amplio como el intervalo de confianza, que indica con un cierto grado de certidumbre (generalmente 95%), el intervalo, incluyendo desde el valor más pequeño hasta el más alto, en el cual es plausible situar a la población general, con la hipótesis de que únicamente una variación aleatoria ha creado discrepancias entre el valor real en la población y el valor medido en nuestra muestra.

La descripción y el análisis de datos en epidemiología nutricional se realizan a través de diferentes procedimientos estadísticos (Tabla 10-3). El criterio para seleccionar el mejor procedimiento para cada estudio se basa en la naturaleza de la variable considerada como “resultado” o variable dependiente. Se pueden utilizar tres tipos de variables dependientes: 1) variable cuantitativa (habitual); 2) cualitativa (habitualmente dicotómica); y 3) supervivencia o variable temporal.

La validez de la mayoría de los análisis habituales (Tabla 10-4) depende de las asunciones de que (a) los datos son de distribución normal y (b) la variabilidad intragrupos (si se compara) es similar. Los tests de este tipo se denominan “paramétricos” y son sensibles hasta cierto punto a las violaciones de dichas asunciones. Alternativamente, se pueden utilizar los tests “no paramétricos” o de distribución libre, que no dependen de una distribución normal. Los tests no paramétricos son también útiles para aplicar a datos recogidos como variables ordinales, ya que se basan en valores de rango. En relación a sus homólogos paramétricos, los tests no paramétricos tienen la ventaja de la facilidad, pero la desventaja es que tienen menor poder estadístico. Una desventaja adicional es que no permiten estimar intervalos de confianza para la diferencia de medias.

Un problema común en la investigación nutricional es el análisis de la significación múltiple. Algunos de los métodos que se deben considerar en estos casos son los análisis de varianza junto con métodos de comparación múltiple especialmente diseñados para realizar análisis pareados, como son los análisis *post-hoc*: procedimientos del método de la mínima diferencia significativa, Bonferroni, Scheffe, Dunnet o el test de Duncan. En casos de comparación múltiple con un número importante de variables, se suele recomendar aplicar correcciones estadísticas a las significaciones encontradas, siendo las más habituales la de Bonferroni (más restrictiva) o la Hochberg-Benjamini (más permisiva). El análisis de varian-

Tabla 10-3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS HABITUALMENTE UTILIZADOS EN EPIDEMIOLOGÍA NUTRICIONAL

Variable dependiente (resultado)	Descripción univariante	Comparaciones bivariadas	Análisis multivariante
Cuantitativa (normal)	Media Desviación estándar	Test t (2 grupos) ANOVA (> 2 grupos) Regresión y correlación (2 variables cuantitativas)	Regresión múltiple
Cualitativa (dicotómica)	Proporciones Emparejamientos	Chi cuadrado Test exacto de Fisher Matrices	Regresión logística múltiple
Supervivencia	Estimaciones/dispersiones de Kaplan-Meier (producto-límite)	Test logarítmico (Mantel-Haenszel)	Modelo de riesgos proporcionales (regresión Cox)

Tabla 10-4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS HABITUALES EN COMPARACIONES BIVARIADAS DE LAS MEDIAS

	TEST ESTADÍSTICO			
	2 muestras		> 2 muestras	
	Paramétrico	No paramétrico	Paramétrico	No paramétrico
Muestras independientes	Test de la <i>t</i> de Student	Test <i>U</i> de Mann-Whitney	Análisis de varianza (ANOVA)	Test de Kruskal-Wallis
Muestras relacionadas pareadas	Test <i>t</i> pareado	Test de Wilcoxon	Análisis de varianza para medidas repetidas y tests factoriales	Test de Friedman

za también se puede utilizar utilizando medidas replicadas como variable continua.

La correlación es el método estadístico recomendado cuando se estudia la asociación entre dos variables continuas. El grado de asociación se mide generalmente mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Este cálculo conlleva a un valor entre -1 y $+1$. El coeficiente de correlación es positivo cuando los valores más altos de una variable se asocian con valores más altos de otra variable, mientras que será negativo si una variable tiende a disminuir mientras que la otra aumenta. El coeficiente de correlación es una medida de dispersión de los puntos cuando representamos gráficamente dos variables. Cuanto mayor sea la dispersión de los puntos, menor será la correlación. La correlación implica una simetría entre dos variables cuantitativas y no pretende describir su relación. El homólogo no paramétrico del coeficiente de correlación de Pearson es la correlación de categorías de Spearman. Éste es el único método no paramétrico que permite estimar intervalos de confianza.

Para describir la relación existente entre dos variables continuas, el modelo matemático más utilizado es el lineal, conocido como análisis de regresión lineal simple. El análisis de regresión se suele utilizar no sólo para cuantificar la asociación entre dos variables, sino también para realizar predicciones basadas en la relación lineal. En la actualidad, los epidemiólogos nutricionales utilizan habitualmente los métodos estadísticos de análisis multivariante (Tabla 10-3). Estos métodos aportan una visión más precisa de la relación

entre las exposiciones dietéticas y la ausencia de las mismas con la aparición de enfermedad u otro resultado, a la vez que ajustan simultáneamente para diferentes variables y suavizan las irregularidades que subgrupos pequeños pueden introducir en los procedimientos alternativos de ajuste, como el análisis estratificado.

La mayoría de métodos multivariantes se basan en el concepto de la regresión lineal simple. Una variable dependiente cuantitativa (resultado) explicada por la influencia de varias variables independientes (exposiciones) son la base del modelo de regresión múltiple. Sin embargo, es habitual que la variable dependiente o el resultado sea dicotómico (enfermedad/ausencia de enfermedad) y que este resultado se explique por la exposición a diferentes factores independientes (dietéticos y no dietéticos). En el caso más habitual, el método multivariante que se debe aplicar es la regresión logística múltiple. Cuando, en un estudio prospectivo, se toma en cuenta también el tiempo que tarda en acontecer el efecto o la enfermedad, dando más valor a los casos tempranos que a los tardíos, el método multivariante que se debe aplicar es el modelo de riesgos proporcionales (regresión Cox), cuyo efecto es una variable en función del tiempo que tarda en aparecer el efecto (Tabla 10-3).

DISEÑOS EPIDEMIOLÓGICOS

La epidemiología es una ciencia relacionada con la salud que estudia la distribución y los

determinantes de salud o enfermedad en las poblaciones. La epidemiología nutricional integra los conocimientos derivados de la investigación en nutrición, de cara a poder evaluar las relaciones dieta-enfermedad a nivel de poblaciones en vida libre. La epidemiología nutricional proporciona evidencia científica para poder comprender el papel de la nutrición en las causas y los mecanismos de prevención de la enfermedad.

La exposición, desde un punto de vista epidemiológico describe el estilo de vida o los factores ambientales que pueden ser relevantes para la salud, mientras que el resultado o la consecuencia es otro término genérico empleado para describir los eventos relacionados con la salud o variables, que están siendo estudiados en relación al efecto que produce una exposición. En la epidemiología nutricional, la exposición primaria de interés normalmente es la ingesta dietética, mientras que las medidas de las consecuencias normalmente implican indicadores del estado nutricional (antropometría, signos clínicos del estado de salud/enfermedad, medidas biológicas o fisiológicas, o hábitos dietéticos). Las principales medidas para determinar la frecuencia de un resultado utilizadas en epidemiología son la prevalencia y la incidencia.

La **prevalencia** de un resultado es la proporción de sujetos en una población que presentan el resultado en un momento determinado. El numerador de la prevalencia es el número de casos existentes y su denominador es la población total.

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{N.º casos}}{\text{Población total}}$$

La **incidencia** de un resultado es la proporción de nuevos casos que suceden en una población durante un período de observación. El numerador de la incidencia es el número de nuevos casos desarrollados durante el período de seguimiento, mientras que el denominador es la población total que estaba en riesgo al inicio del seguimiento.

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{N.º nuevos casos}}{\text{Población en riesgo (al inicio)}}$$

Cuando se calcula con la expresión anterior, la incidencia es una proporción. Sin embargo, la incidencia también se puede expresar como una

tasa (velocidad o densidad) incluyendo en el denominador el tiempo durante el cual cada persona ha sido observada. En este caso se denomina tasa de incidencia o densidad de incidencia, y se expresa como el número de casos nuevos por persona y tiempo de observación.

El primer paso crítico en la investigación epidemiológica se encuentra en el desarrollo de un objetivo de estudio claramente definido. El investigador debe tener un conocimiento sólido de la literatura científica relacionada y ya publicada. El objetivo debe ser específico (relacionando exposiciones concretas con unas consecuencias determinadas), factibles (debe ser posible medir el nivel de exposición y de la consecuencia con la suficiente exactitud), y relevante (las exposiciones concretas que se midan deben estar relacionadas causalmente a las consecuencias, las cuales serán por sí mismas marcadores de enfermedad). La comparación y elección de los diferentes diseños de estudio epidemiológico dependen de las medidas de exposición, medidas de los resultados, coste y duración estimada del seguimiento.

Además, la interpretación de los estudios epidemiológicos debería estar enfocada a la identificación y el control de las principales fuentes de error y de su impacto sobre los resultados obtenidos.

La selección de un método de estudio se ve habitualmente influida por cuestiones pragmáticas como la facilidad de ejecución, además de las cuestiones éticas. Los estudios epidemiológicos se pueden dividir en dos categorías principales: estudios experimentales y no experimentales (observacionales). Los estudios observacionales pueden a su vez dividirse en estudios descriptivos y analíticos. En un sentido amplio, un experimento de epidemiología nutricional es un conjunto de observaciones, dirigidas bajo circunstancias controladas, en las cuales el científico manipula las condiciones para averiguar el efecto de dicha manipulación en las observaciones.

En la experimentación biológica, no es posible para el científico tener un control completo de todas las circunstancias relevantes, y la manipulación consistirá en incrementar al máximo el grado de variación en el factor investigado. Lo ideal sería obtener dos conjuntos de circunstancias prácticamente idénticas, donde todos los factores sean iguales. Si se introduce posterior-

mente una importante variación en sólo uno de esos conjuntos, todas las diferencias observadas entre los dos grupos se atribuirían causalmente al único factor que ha sido manipulado por el investigador.

Los diseños experimentales epidemiológicos son aquéllos en los que es el propio investigador el que asigna la exposición a cada sujeto. En estos estudios, el tratamiento (o exposición) se asigna con el objetivo de obtener el máximo grado de comparación entre los grupos tratados y los no tratados en lo que se refiere a todas las demás características de los sujetos distintas del tratamiento o la exposición de interés. En la investigación en Epidemiología el mejor camino para obtener conjuntos idénticos de factores y circunstancias es asignar aleatoriamente a los sujetos al grupo de exposición o al grupo control. Este proceso se denomina **aleatorización**, y todos los estudios aleatorizados son diseños experimentales.

También se pueden diseñar estudios experimentales asignando a todo un grupo de población diferentes exposiciones. Estos estudios se denominan **estudios comunitarios**. Por ejemplo, si a toda una localidad se le asigna un programa educativo sobre alimentación sana y a otra localidad vecina se le asigna el control (sin programa educativo), estaríamos llevando a cabo un estudio comunitario siempre que éticamente sea correcto. Sin embargo, cuando el número de unidades aleatorizadas es escaso, aunque cada unidad sea grande, no podríamos asegurar que los grupos

comparados son iguales. En cambio, si la aleatorización se ha realizado sobre una base individual y la muestra total es suficientemente grande, un esquema aleatorio cumplirá generalmente su objetivo y distribuirá los participantes en grupos esencialmente homogéneos, tanto respecto a los factores medidos como a los no medidos. Este equilibrio hace que los grupos sean comparables directamente y garantiza la validez de las inferencias causales extraídas a partir de un diseño aleatorizado (aleatorización individual).

En general, los experimentos proporcionan la evidencia más fuerte para determinar el efecto de una exposición sobre el resultado. Los estudios experimentales son, inferencialmente, los diseños más potentes para demostrar la causalidad, pero pueden surgir problemas éticos, ya que el esquema de asignación aleatoria se emplea no para ayudar al paciente, sino al experimento. Los sujetos se exponen únicamente para cubrir las necesidades del protocolo del estudio y no las necesidades individuales de cada participante. Por tanto, los experimentos aleatorizados con humanos sólo se pueden llevar a cabo siguiendo requerimientos éticos estrictos. No es permisible realizar experimentos en los que la exposición sea potencialmente dañina. Por tanto, y bajo estas condiciones, deben emplearse los diseños de estudios no experimentales (observacionales). La elección del diseño en epidemiología nutricional requiere tener en cuenta el escenario, la utilidad, las ventajas y las limitaciones (Tabla 10-5).

Tabla 10-5. OPCIONES DE DISEÑO DE ESTUDIOS EN EPIDEMIOLOGÍA NUTRICIONAL

Diseño	Escenario	Utilidad	Ventajas	Limitaciones
Ensayo de intervención	Prevención secundaria (participantes enfermos)	Asociación tratamiento-resultado	La mayor evidencia de causalidad y validez interna y bajo potencial de parcialidad	Baja validez externa Problemas éticos Coste elevado
Estudio de campo	Prevención primaria (participantes sanos)	Asociación exposición-aparición de enfermedad	Evidencias de causalidad fuertes, alta validez interna y bajo potencial de parcialidad	Muestras muy grandes y periodos de seguimiento largos Baja validez externa Sólo se pueden evaluar relaciones nutriente-efecto Los costes más elevados

Tabla 10-5. OPCIONES DE DISEÑO DE ESTUDIOS EN EPIDEMIOLOGÍA NUTRICIONAL (cont.)

Diseño	Escenario	Utilidad	Ventajas	Limitaciones
Estudio comunitario	Aleatorización de grupos (pueblos, escuelas, etc.)	Evaluación de intervenciones comunitarias o actividades educativas	Si los grupos pequeños y grandes se aleatorizan, mismas ventajas que los ensayos experimentales	Baja validez interna si el número de unidades aleatorizadas es bajo
Cuasi-experimental	Estudio de intervención (no aleatorizado)	Asociación causa-efecto asignación de exposición no aleatorizada	Elevada viabilidad, más aplicables y exposición controlada por el investigador	Dificultad para encontrar grupos comparables Elevado potencial de parcialidad Tendencias escondidas pueden alterar los resultados
Cohortes	Participantes inicialmente clasificados como expuestos o no expuestos y seguidos durante un periodo de tiempo para observar la incidencia del resultado	Asociaciones dieta-salud La herramienta observacional más importante que se tiene en Epidemiología nutricional	Bajo potencial de parcialidad y capacidad para estudiar exposiciones raras, patrones dietéticos complejos y resultados múltiples de una sola exposición Permite estimaciones directas de riesgo y tasas Mínimos problemas éticos	Muestra grande y periodo de seguimiento muy largo Imposible investigar acontecimientos raros Parcialidad por bajo seguimiento, necesario participantes colaboradores Coste elevado
Caso-control	La exposición se compara entre sujetos con o sin el resultado buscado	Asociaciones dieta-salud Herramienta analítica práctica en Epidemiología nutricional	Posibilidad de estudiar resultados o efectos raros, múltiples causas potenciales de un solo efecto, no existen problemas de pérdida de voluntarios durante el seguimiento, bajo coste Mínimos problemas éticos	Riesgo de parcialidad en el recuerdo de la exposición y en la participación de los controles Imposible estudiar exposiciones raras y múltiples acontecimientos de una sola exposición Imposibilidad de estimar tasas y riesgos
Transversal	La exposición pasada y las consecuencias se estudian simultáneamente en una muestra representativa de la población	Estimación de la prevalencia de enfermedad o exposición Evaluación poblacional en programas de salud Monitorización de tendencias si se realizan estudios periódicos	La más alta validez externa Coste relativamente bajo Problemas éticos mínimos Posibilidad de recoger un amplio espectro de información relativa a la dieta y a la salud	Dificultad de evaluar la secuencia temporal: baja capacidad para interferencias causales, potencial parcialidad en participación y respuesta

Tabla 10-5. OPCIONES DE DISEÑO DE ESTUDIOS EN EPIDEMIOLOGÍA NUTRICIONAL (cont.)

Diseño	Escenario	Utilidad	Ventajas	Limitaciones
Ecológico	Las unidades de estudio son grupos, no individuos	Monitorización de tendencias a lo largo del tiempo, comparación de disparidades	Los estudios más rápidos y baratos Buena calidad descriptiva	La más alta probabilidad de encontrar parcialidad incorregible Su viabilidad depende de la disponibilidad de datos agregados preexistentes

Epidemiología no experimental (observacional)

Los nutricionistas y epidemiólogos intentan simular los experimentos con diseños observacionales cuando dichos experimentos no son factibles o serían poco éticos. En las investigaciones experimentales, las exposiciones son asignadas a los sujetos por el investigador, mientras que en los estudios observacionales el investigador no tiene control sobre la exposición, ya que en estos estudios no experimentales los sujetos, mediante su modo de vida, se asignan objetivamente al grupo de expuestos o al grupo control (Fig. 10-1). En los estudios observacionales el investigador se aprovecha de los “experimentos naturales”, donde la exposición sólo aparece en grupos definidos.

Los diseños observacionales pueden a su vez clasificarse en cuatro subgrupos principales: estudios de cohortes, caso-control, transversales y ecológicos. Entre estos subtipos, las principales diferencias vienen dadas por el momento en el que se tomaron medidas de exposición y de resultados. Los estudios de cohortes miden la exposición en el presente y los resultados se establecen en el futuro; en los estudios de caso-control el resultado se mide en el presente, y se establece la exposición anterior; mientras que en los estudios transversales (de prevalencia) se miden tanto la exposición como sus consecuencias en tiempo presente y en el mismo momento.

Los estudios epidemiológicos también se pueden clasificar en relación a si las medidas de exposición y efecto se han realizado en poblaciones o

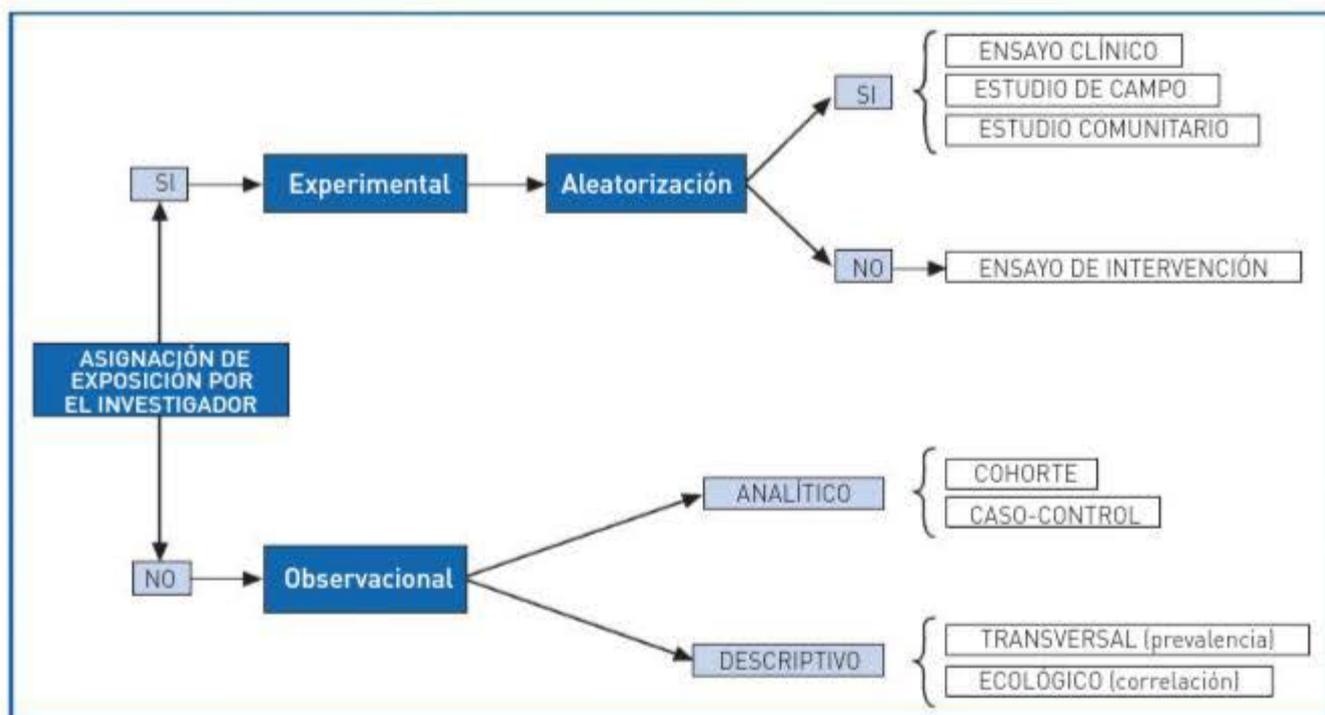


Figura 10-1. Clasificación de los diseños epidemiológicos.

en individuos. Las investigaciones observacionales en las que la unidad de estudio y análisis no es el individuo, sino un grupo de población entero, se llaman **estudios ecológicos**. En los estudios ecológicos, se comparan las medidas de exposición recogidas y agregadas rutinariamente a nivel de hogar, local, regional, nacional o internacional, con los resultados agregados a ese mismo nivel. Por ejemplo, si las tasas de mortalidad para el cáncer de colon en varios países se dibujan frente a la ingesta media de grasa saturada en esos mismos países y se calcula la correlación entre ambas variables, se está realizando un estudio ecológico.

Los estudios que consideran al individuo como unidad de seguimiento son siempre preferibles, ya que en estudios individuales es posible relacionar la exposición con el efecto de forma directa, previniendo numerosas desviaciones y riesgos que pueden invalidar los hallazgos de estudios ecológicos. Una de las principales ventajas de los estudios individuales frente a los estudios ecológicos es que permiten la estimación directa del riesgo de enfermedad en función del nivel de exposición.

Los estudios ecológicos evalúan la ingesta dietética de un modo menos preciso, ya que usan el consumo medio como valor de exposición para todos los individuos en los grupos que se comparan, provocando un elevado potencial de desviación en la estimación de las asociaciones entre dieta y enfermedad. Los estudios ecológicos, también denominados estudios de correlaciones, pueden comparar indicadores de la dieta total y el estado de salud o enfermedad dentro de una misma población a lo largo del tiempo para observar tendencias seculares, o para comparar las tasas de incidencia de enfermedad y los patrones de ingesta dietética de grupos migratorios con respecto a poblaciones comparables en su país actual y en el de origen. Las comparaciones ecológicas han sido importantes para formular hipótesis de asociaciones entre dieta y enfermedad, sin embargo no son útiles para establecer relaciones causales.

Las **encuestas transversales** proporcionan una "instantánea" de datos epidemiológicos descriptivos respecto a la nutrición, identificando las necesidades nutricionales de una población y creando las bases para la promoción de la salud y programas de prevención de enfermedades en un momento determinado de tiempo. Los **estudios de cohortes** son generalmente longitudinales y pros-

pectivos, con sujetos a los que se sigue a lo largo del tiempo durante un período definido previamente, para evaluar la aparición de enfermedad. En algunos casos también pueden ser retrospectivos (cohortes históricas), con grupos identificados al inicio de la exposición en el pasado y posteriormente seguidos desde ese momento hasta el presente para establecer la presencia o ausencia de enfermedad. La viabilidad de cohortes retrospectivas depende de la disponibilidad de datos de calidad en archivos ya existentes. Los costes de investigación asociados a diseños de estudios de cohortes significan que dichos estudios son menos habituales que otras aproximaciones. No obstante, el sustancial esfuerzo que significa desarrollar grandes estudios de cohortes en epidemiología nutricional, ha comenzado a materializarse en las dos últimas décadas.

En los **estudios de caso-control** los sujetos son identificados y reclutados en base a la presencia o ausencia de enfermedad o la variable del estado de salud/nutrición de interés. En un diseño ideal, los controles se seleccionan al azar de la misma base de datos que los casos, aplicándose en cada grupo idénticos criterios de inclusión y exclusión. La presencia de exposiciones dietéticas específicas u otros factores que tengan un interés etiológico en esos sujetos se suelen establecer a través de entrevistas, cuestionarios o por la revisión de las historias clínicas. Dentro del marco general de los estudios de caso-control, existen diferentes opciones relativas al diseño del estudio y la selección de controles.

Por ejemplo, los controles deben estar pareados con los casos a nivel individual en base a la edad, género y otras variables que se cree que pueden afectar al riesgo de padecer la enfermedad. El pareado elimina la variabilidad entre casos y controles respecto a las variables del pareado y, por tanto, proporciona mayor eficacia en el análisis. Sin embargo, el pareado no puede controlar los efectos contundentes de los factores de riesgo observados en la relación. Los estudios caso-control son, con diferencia, los diseños más viables de todos los estudios analíticos en Epidemiología, pero su aplicación sobre temas de interés para los nutricionistas es limitada por la propia y singular relación entre la nutrición y la enfermedad.

La posibilidad de llegar a comprender bien una comparación transversal de exposiciones dietéticas entre casos y controles es limitada debido a la posi-

bilidad de que los patrones dietéticos de los sujetos hayan cambiado desde el momento en que la dieta fue un factor importante en el desarrollo de la enfermedad. Los estudios retrospectivos de caso-control intentan superar esta limitación estimando la ingesta pasada a través de cuestionarios de frecuencia de consumo o métodos de historia dietética. Uno de los problemas es que el recuerdo de la dieta pasada en el grupo de casos se puede ver influido por el estado presente de su enfermedad.

Un factor importante a la hora de decidir entre un diseño de caso-control o de cohortes es conocer si la exposición o el resultado que se busca son raros (muy baja incidencia). Si el resultado es raro, se prefieren estudios de caso-control, ya que en un estudio de cohortes se necesitaría una muestra muy amplia para obtener el suficiente número de sujetos con diferentes niveles de exposición. Si la exposición es rara (escasa), son preferibles los estudios de cohortes. Dado que los estudios ecológicos se basan en datos agregados, generalmente recogidos de grandes grupos de población (pueden llegar a ser datos de todo un país), son útiles para estudiar tanto exposiciones como efectos, tanto raros como comunes, en una fase preliminar de la investigación.

Los estudios de cohortes permiten evaluar numerosos efectos, mientras que los estudios de caso-control están restringidos al estudio de un solo efecto, aunque en éstos últimos se pueden estudiar varias exposiciones. Si se necesita una medida absoluta del efecto de una exposición, el único diseño apropiado es un estudio de cohortes, ya que los estudios caso-control no pueden estimar incidencias. Los estudios transversales únicamente pueden estimar prevalencias. Generalmente, los estudios de cohortes son caros y se necesita mucho tiempo para completarlos, aunque no siempre ocurre así. Los estudios caso-control son normalmente más baratos y se terminan antes.

Epidemiología experimental

La epidemiología experimental intenta desarrollar estudios controlados, en los cuales es el propio investigador el que asigna la exposición. Sin embargo, los estudios en humanos implican, al contrario que en los estudios con modelos animales, aspectos y factores que el investigador es

incapaz de controlar. En especial cuando estos estudios se llevan a cabo con población en condiciones de vida libre. Esta área de la Epidemiología está dominada por dos diseños de estudio: los **ensayos aleatorizados controlados** y los **estudios cruzados**. En estos estudios los sujetos son aleatoriamente asignados bien al grupo de expuestos o al grupo control (no expuestos), generalmente denominados grupo de tratamiento y grupo placebo, respectivamente. El placebo es una sustancia indistinguible de la de tratamiento y permite tanto a los investigadores como a los sujetos del estudio estar “cegados” ante el tratamiento, ya que no conocen cuál es la sustancia activa y cuál el placebo. Los cambios en los indicadores del estado de salud y de enfermedad se comparan entre los dos grupos al final del experimento para identificar el efecto de la exposición.

Los estudios cruzados funcionan, en epidemiología nutricional, con las mismas bases que los estudios de medidas repetidas en la investigación básica. Todos los sujetos del estudio reciben tanto el tratamiento como el control durante períodos iguales de tiempo, con un período de lavado entre tratamientos y el orden en el que se administra el tratamiento o el placebo es asignado al azar para cada sujeto del estudio. Los diseños cruzados son apropiados únicamente para estudios con tratamientos cuyos efectos no duran en el tiempo, lo cual limita bastante su utilidad en la Epidemiología nutricional.

En general, los diseños de estudios de Epidemiología experimental son adecuados para identificar relaciones causales entre exposiciones determinadas y los indicadores de salud o enfermedad. La aplicación de estos métodos está limitada, sin embargo, por la dificultad en el control de las exposiciones y por el enorme coste asociado a los ensayos en poblaciones dirigidos a modificar riesgos de enfermedad o enfermedades crónicas. Probablemente es más factible aplicar diseños experimentales para contrastar los efectos de dosis farmacológicas de nutrientes específicos o de componentes de alimentos cuyas exposiciones pueden ser más fácilmente controlables. Esta aproximación ha sido cada vez más empleada durante la última década para evaluar los efectos de micronutrientes específicos (beta-carotenos, alfa-tocoferol, ácido fólico y otros minerales y vitaminas) en estudios aleatorizados de gran escala.

Estos estudios mantienen la validez interna más elevada entre los diseños epidemiológicos y, por tanto, proporcionan la evidencia más convincente para constatar relaciones causa-efecto. Sin embargo, corren el riesgo de carecer de capacidad de generalización (por ejemplo, tener poca validez externa) y su aplicabilidad en poblaciones de vida libre puede resultar pobre en el grado que los patrones de ingesta de alimentos no corresponden a nutrientes aislados, sino al consumo de comidas más complejas. Además, el tiempo de inducción necesario para valorar el efecto de una causa determinada puede ser más largo que el tiempo de observación del ensayo aleatorizado y, por tanto, excluir la capacidad del ensayo de establecer la relación causal.

Los **estudios cuasi-experimentales** son aquellos en los que la asignación de la exposición está controlada por el investigador, pero los sujetos no se distribuyen en grupos al azar. En ocasiones se les denomina **ensayos de intervención**. Cuando únicamente se compara un micronutriente frente a placebo, el ensayo se considera **ensayo simple**, mientras que los **ensayos múltiples o factoriales** son aquellos diseños que compara varios micronutrientes frente a un placebo. En un diseño factorial 2×2 dos tratamientos se evalúan simultáneamente a través de cuatro grupos (tratamiento A, tratamiento B, tratamiento A + B y placebo).

Algunos ensayos aleatorizados se denominan ensayos de prevención primaria, mientras que otros se denominan ensayos de prevención secundaria. Los ensayos de **prevención primaria** son aquellos llevados a cabo en individuos sanos, con el objetivo de prevenir la aparición de enfermedad. Por ejemplo, en el “Estudio de Prevención del Cáncer del Alfa-tocoferol, Beta-caroteno” casi 30.000 participantes fueron aleatoriamente asignados a recibir suplementos de alfa-tocoferol, de beta-caroteno, ambos o placebo, para prevenir la aparición de cáncer de pulmón (diseño factorial 2×2). Todos los participantes estaban libres de esta enfermedad al inicio del estudio y fueron seguidos durante varios años para evaluar la incidencia de cáncer de pulmón. Esto es un ejemplo de estudio de prevención primaria, también llamado **estudio de campo**.

Los ensayos de **prevención secundaria** se realizan entre pacientes que ya sufren una enfermedad determinada y que son asignados aleatoriamente a un grupo de tratamiento o placebo para

prevenir acontecimientos adversos. Por ejemplo, en el “Estudio del Corazón de Lyon”, los pacientes fueron aleatorizados en dos grupos con distintos patrones dietéticos después de haber sufrido infarto de miocardio. El acontecimiento no era la aparición de enfermedad, sino la incidencia de reinfarcto o muerte cardíaca durante el período de seguimiento.

Otros métodos epidemiológicos

También se han realizado estudios epidemiológicos para evaluar las actitudes de los consumidores hacia y sobre los alimentos, la nutrición, patrones físicos y la salud, para proporcionar a los actores políticos, los investigadores y la industria alimentaria datos útiles para promocionar mensajes saludables respecto a la relación entre la alimentación o la ingesta de nutrientes y las enfermedades crónicas. Estas encuestas buscan información sobre las influencias en la elección de alimentos, determinantes de salud, criterios relativos a la percepción de la alimentación saludable, fuentes estables de información nutricional, beneficios esperados y barreras para la implementación de una dieta sana, de cara a poder identificar los conocimientos del consumidor, actitudes y creencias respecto a las interacciones alimentación-salud y para promover mensajes educativos sobre nutrición más enfocados a la población diana.

El papel de los **metaanálisis** en la combinación sistemática de los resultados publicados sobre ensayos aleatorizados se ha convertido en algo habitual, pero su lugar en la Epidemiología observacional ha sido controvertido, a pesar de su amplio uso en las Ciencias Sociales. Algunos autores defienden que combinar los datos de ensayos aleatorizados es útil, ya que la potencia estadística se eleva sin comprometer la validez, ya que los grupos comparados han sido aleatorizados, pero en la Epidemiología observacional el asunto de la validez está muy determinado por la parcialidad y los factores de confusión más que por las limitaciones de la potencia estadística. Por tanto, la mayor precisión estadística obtenida mediante la combinación de datos puede resultar errónea, ya que la validez de los hallazgos puede seguir siendo nula. Una alternativa a la combinación de datos epidemiológicos publicados es la creación de un

fondo común y el análisis de los datos primarios de todos los estudios disponibles sobre un tema concreto y que reúnen los requisitos especificados. En teoría, lo ideal sería conseguir la colaboración de todos los investigadores originales, que están familiarizados con los datos y sus limitaciones. Este tipo de estudios, junto con la combinación de los datos originales de varios estudios son la base de los denominados **análisis combinados** o **proyectos de conjunto** (metaanálisis).

En un análisis combinado, el rango de factores dietéticos que se pueden estudiar puede ser considerablemente mayor que en los análisis separados, ya que en un estudio aislado se tienen pocos sujetos en ingestas extremas, y a veces porque estos estudios variarán en la distribución de factores dietéticos. Las ventajas de los análisis combinados en Epidemiología nutricional son tan sustanciales que estos análisis se están convirtiendo en una práctica habitual para temas importantes, como la relación ingesta de alcohol y el cáncer de mama, la talla y el cáncer de mama o las bebidas alcohólicas y la enfermedad coronaria.

El análisis de datos epidemiológicos necesita que se consideren cuidadosamente los criterios de calidad aceptable de los datos, pero también sobre la presentación de variables independientes categorizadas o continuas, y la aplicación de puntuaciones empíricas. El estudio de análisis de subgrupos (anidados), interacciones y correcciones de errores son otros temas de interés. Otras limitaciones de estos análisis es establecer las necesidades de tamaño muestral para considerar el es-

tudio representativo, el cumplimiento, las inexactitudes en la información recogida en estudios retrospectivos y los efectos confundentes de factores asociados.



PERSPECTIVAS EN EL FUTURO

El futuro de la investigación en nutrición debe pasar por el desarrollo de nuevos métodos de estudio de los procesos mediante los cuales las células, los tejidos y el cuerpo entero obtienen y utilizan sustancias contenidas en alimentos y bebidas, con el objetivo de mantener su estructura y funciones de modo saludable. Contarán con especial atención las estrategias basadas en la Biología molecular y celular, enfocadas en tener una mejor comprensión de las bases genéticas de los resultados relativos a la nutrición personalizada.

También cabe esperar que numerosos estudios de cohortes de larga duración, con decenas de miles de participantes, aporten información valiosa sobre el papel de la nutrición en la prevención de enfermedades, pero también sobre la regulación nutricional de numerosas enfermedades a través de medios dietéticos y conociendo las relaciones gen-nutriente y gen-ambiente. Además, la recopilación de datos de numerosos estudios de cohortes puede proporcionar una herramienta muy poderosa para evaluar los beneficios de una dieta sana. El interés creciente en una aproximación de patrones dietéticos, en lugar de la clásica aproximación de nutrientes aislados se reflejará en las próximas décadas en epidemiología nutricional.

BIBLIOGRAFÍA

- Ansorena D, Martínez JA (2010). Alimentación, ejercicio físico y salud. Eunsa, Pamplona.
- Astiasarán I, Martínez JA (2000). Alimentos: composición y propiedades. McGraw-Hill, Pamplona.
- Burke L (2010). Nutrición en el deporte. Panamericana, Madrid.
- Cervera P, Clapes J, Rigolfas R (2009). Alimentación y dietoterapia. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- CESNID (2008). Tablas de composición de alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (2008). Nutrición y dietética. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid.
- Cuervo M, Ruiz de las Heras A (2004). Alimentación hospitalaria. Dietas hospitalarias. Díaz de Santos, Madrid.
- Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD) (2010). Ingestas dietéticas de referencia (IDR) para la población española. Eunsa, Pamplona.
- Garrow JS, James WPT (2001). Human Nutrition and Dietetics. Ch. Livingstone, New York.
- Gibney MJ, Macdonald IA, Roche HM (2009). Nutrición y metabolismo. Acribia, Zaragoza.
- Gibson RS (2005). Principles of Nutritional assessment. Oxford University Press, Oxford.
- Gil A (2010). Tratado de nutrición. Panamericana, Madrid.
- Hernández-Aguado I, Gil de Miguel A, Delgado Rodríguez M, Bolumar Montrull F (2005). Manual de epidemiología y salud pública. Panamericana, Madrid.
- Hernández Sampieri R, Fernández-Collado C, Baptista Lucio P (2007). Metodología de la investigación. McGraw-Hill, México DF.
- Ibáñez J, Astiasarán I (2010). Alimentación y deporte. Eunsa, Pamplona.
- Mahan LK, Escott-Stump S (2008). Dietoterapia de Krause. Elsevier-Masson, Barcelona.
- Mariné A, Codony R, Vidal MC (1993). Interacción entre fármacos y alimentos. Colegio Oficial de Farmacéuticos, Madrid.
- Martínez JA, Astiasarán, I, Muñoz M, Cuervo M (2004). Alimentación hospitalaria. Fundamentos. Díaz de Santos, Madrid.

- Martínez-González MA (2007). Bioestadística amigable. Díaz de Santos, Madrid.
- Mataix J, Mañas M (2009). Tabla de composición de alimentos españoles. Universidad de Granada, Granada.
- Mataix J (2009). Nutrición y alimentación humana. Ergon, Madrid.
- Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C (2009). Tablas de composición de alimentos. Pirámide, Zaragoza.
- Moreno B, Charro A (2006). Nutrición, actividad física y prevención de la obesidad. Panamericana, Madrid.
- Nelson R (2002). Manual de dietética de la Clínica Mayo. Mosby-Doyma, Madrid.
- Ortega RM (2007). Nutrición en población femenina: desde la infancia a la edad avanzada. Ergón, Madrid.
- Requejo AM, Ortega RM (2000). Nutriguía: manual de nutrición clínica en atención primaria. Ed. Complutense, Madrid.
- Rodríguez VM, Simón E (2008). Bases de la alimentación humana. Netbiblo, La Coruña.
- Ruiz de las Heras A, Martínez JA (2010). Elementos de Dietoterapia. Eunsa, Pamplona.
- Salas-Salvadó J, Bonada A, Trallero R, Saló ME, Burgos R (2008). Nutrición y dietética clínica. Elsevier Masson, Barcelona.
- Shills ME, Olson JA, Shike M (2002). Nutrición en salud y enfermedad. McGraw-Hill, Mexico.
- Tojo R (2001). Tratado de nutrición pediátrica. Doyma, Barcelona.
- Waterbeemd H, Lennernäs H, Artursson P (eds) (2003). Drug bioavailability: estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability. Wiley, Weinheim.
- Willet W (1998). Nutritional Epidemiology. Oxford University Press, Oxford.

METODOLOGÍA Y APLICACIONES

Sección 1. Utilización de nutrientes

Sección 2. Evaluación del estado nutricional

Sección 3. Nutrición humana y dietética

Sección 4. Investigación en nutrición

Sección 5. Elementos de aplicación en nutrición y dietética

1. Determinación de la energía bruta de un alimento mediante bomba calorimétrica adiabática
2. Digestión de nutrientes: amilasa salival
3. Absorción intestinal de azúcares
4. Determinación del índice glucémico de los alimentos
5. Valoración del gluten en los alimentos
6. Adipocitos y adipoquinas: cultivo primario de adipocitos de rata
7. Determinación de la actividad lipolítica *in vitro*
8. Capacidad lipogénica
9. Metabolismo hepático del colesterol
10. Influencia de la fibra sobre el nivel de colesterol en hígado y heces
11. Evaluación de la calidad nutritiva de las proteínas: índices químicos e índices biológicos
12. Aminoácidos en alimentos destinados a población con aminoacidopatías
13. Alcoholemia como índice de consumo
14. Efecto de la ingesta de agua y minerales en la regulación del equilibrio hidroelectrolítico
15. Utilización nutritiva de β -carotenos
16. Utilización nutritiva de la vitamina C en función de las necesidades fisiológicas
17. Estudio del efecto de la vitamina D en el recambio óseo mediante el análisis de marcadores bioquímicos: hidroxipirrolina y calcio en orina
18. Efectos tóxicos del alcohol: cirrosis hepática
19. Estudio del metabolismo basal en humanos
20. Determinación del grado de utilización energética de los alimentos a partir del cociente respiratorio

Determinación de la energía bruta de un alimento mediante bomba calorimétrica adiabática

P. Quintero del Rivero y F. I. Milagro Yoldi

INTRODUCCIÓN

La cantidad total de energía que aporta un alimento depende de los nutrientes energéticos que lo componen y puede determinarse mediante el cálculo de su calor de combustión, siendo éste la cantidad de calor liberado cuando se quema u oxida de forma completa una determinada masa, a presión y temperatura constantes. Así, la cantidad de calor producido por un alimento durante este proceso se denomina energía bruta.

Por su parte, dicho calor de combustión puede ser determinado a través de un calorímetro de volumen constante. Este dispositivo mide el calor producido al quemar completamente una muestra de alimento en una atmósfera con exceso de oxígeno (bomba calorimétrica). El calor del alimento es absorbido por un volumen de agua conocido, siendo este aumento de temperatura del agua equivalente a la energía bruta del alimento.

Esta técnica se basa en la Primera Ley de la Termodinámica, que afirma que la energía ni se crea ni se destruye sino que pasa de una forma a otra. En el caso de los alimentos, la ecuación que responde a esta ley es la que hace referencia a la combustión de los nutrientes:



El calor bruto de los diferentes macronutrientes, obtenido a partir de un calorímetro, es el siguiente:

- Hidratos de carbono: 3,9-4,2 kcal/g.
- Lípidos: 9,2-9,5 kcal/g.
- Proteínas: 5,2-5,9 kcal/g.
- Alcohol: 7,1 kcal/g.

Sin embargo, estos valores no son los que se encuentran en las tablas de composición de alimentos ya que éstos hacen referencia a la energía metabolizable, que es aquella que queda disponible para cubrir las funciones y necesidades metabólicas. Así, por ejemplo, la oxidación de las proteínas a nivel celular es incompleta porque se produce también urea y amoníaco como productos finales, por ello su valor en bruto es superior a 4 kcal por gramo.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es determinar, mediante un calorímetro de volumen constante, la cantidad total de energía (energía bruta) que aportan diferentes tipos de alimentos.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

El calorímetro es un recipiente adiabático que contiene una cubeta metálica con una cantidad conocida de agua (normalmente 2 litros), en cuyo interior se introduce la cámara de reacción (bomba calorimétrica) dentro de la cual se pone una cantidad determinada de la sustancia cuyo valor calórico se desea estimar. Se introduce oxígeno dentro de esta cámara y por medio de unos electrodos y un alambre de ignición se produce la combustión de dicha sustancia. Finalmente, el calor producido por la reacción eleva la temperatura del agua, la cual es medida por el termómetro. Partiendo de esta elevación de temperatura y

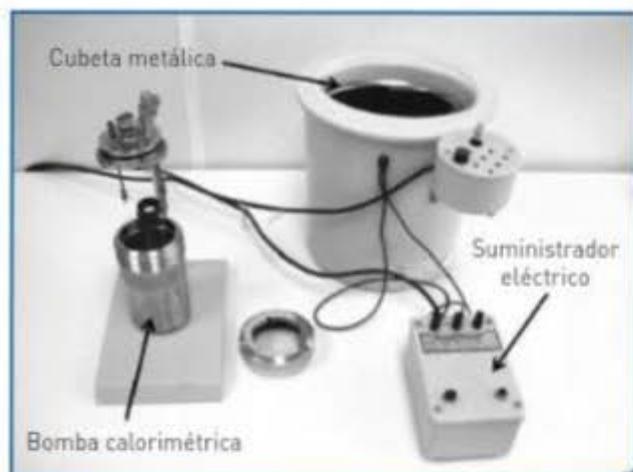


Figura P1-1. Bomba con accesorios.

conociendo la capacidad calorífica del equipo (la cual debe ser restada), se obtiene la energía bruta de la sustancia.

Material y equipos

- Calorímetro de volumen constante con accesorios (Fig. P1-1).
- 2 litros de agua destilada.
- Botella de oxígeno.
- Alambre de ignición de 10 cm por muestra.
- 1 gramo de ácido benzoico.
- 1 gramo de aceite de oliva.
- 1 gramo de harina de trigo.
- Prensador para pastillas.
- Termómetro.
- Balanza.

Protocolo

Primero se debe realizar la prueba con 1 gramo de ácido benzoico, sustancia que se utiliza como patrón para calcular la capacidad calorífica del equipo, y posteriormente los alimentos que se quieran medir. Independientemente de la sustancia a utilizar, el procedimiento se realiza de la siguiente forma:

1. Pesar 1 gramo de la sustancia a utilizar. En caso de ser un líquido coger 1 mililitro y, a poder ser, calcular su peso en la balanza.
2. Para muestras sólidas, hacer una pastilla con el prensador.
3. Poner el gramo de sustancia en el crisol.
4. Atar firmemente el alambre de ignición a los electrodos de la bomba asegurándose que toque la pastilla por la parte superior.

5. Introducir el soporte con el crisol en el interior de la cámara de reacción y cerrar con la tapa de rosca herméticamente (siempre a mano) (Fig. P1-2).
6. Introducir el oxígeno en la bomba, abriendo con cuidado la válvula de la botella hasta llegar a 20 atmósferas.
7. Llenar la cubeta metálica con 2 litros de agua destilada a temperatura ambiente.
8. Poner la cubeta metálica en el recipiente adiabático.
9. Introducir, usando unas pinzas, la bomba calorimétrica dentro de la cubeta metálica.
10. Conectar en la parte superior de la bomba los cables que suministran la energía eléctrica.
11. Colocar la tapa con el agitador del recipiente adiabático e insertar el termómetro (Fig. P1-3).
12. Encender el agitador.
13. Empezar a leer la temperatura del agua cada 30 segundos hasta obtener dos mediciones iguales consecutivas (T_0).
14. Encender la fuente de corriente para provocar la combustión de la muestra.
15. Anotar la temperatura cada 30 segundos hasta obtener dos mediciones consecutivas iguales.
16. Desconectar el agitador y la fuente de corriente.
17. Desconectar los cables de los electrodos y retirar la bomba calorimétrica con las pinzas.
18. Abrir la válvula de la bomba para eliminar el exceso de presión.



Figura P1-2. Bomba calorimétrica.

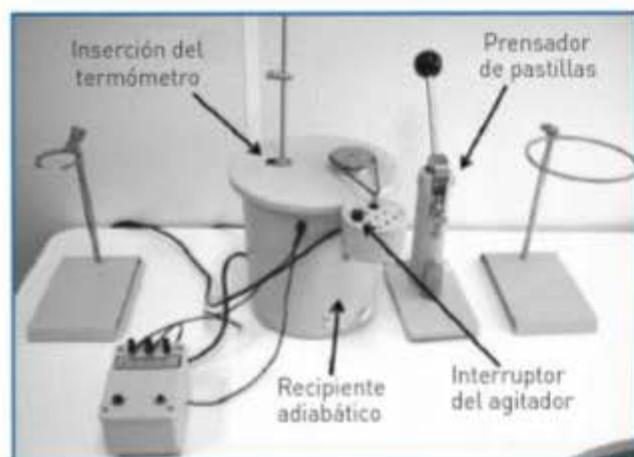


Figura P1-3. Equipo en operación.

19. Desenroscar la tapa de la bomba y abrirla.
20. Medir la longitud del alambre de ignición no quemado.
21. Lavar la bomba y el crisol con agua destilada.

Cálculos

- Comparar los valores experimentales obtenidos con los datos teóricos.
- Explicar las causas de las diferencias entre los valores obtenidos por el calorímetro y los de las tablas de composición de alimentos.

Determinación de la capacidad calorífica del equipo:

$$C_{e, \text{equipo}} = (Q \times m_a) / (m_h \times \Delta T)$$

donde:

$$Q_{\text{Ac. benzoico}} = 6.318 \text{ cal.}$$

m_a = masa del alimento.
 m_h = masa del agua.
 ΔT = diferencia de temperatura.

*En nuestro caso, el valor del calor específico del equipo es de 1,22 cal/g °C.

Determinación del valor calórico del alimento:

$$Q = (\Delta T \times m_h \times C_{e, \text{equipo}} - e_1 - e_2 - e_3) / m_a$$

donde:

ΔT = diferencia de temperatura.
 m_h = masa del agua.
 m_a = masa del alimento.
 e_1 = calor producido por la combustión del alambre (2,3 cal/cm).
 e_2 = calor producido por formación de sulfúrico*.
 e_3 = calor producido por formación de nítrico*.

* En el caso de los alimentos con muy bajo contenido en proteínas, estos valores pueden ser excluidos de la ecuación.

BIBLIOGRAFÍA

- Chang R (2008). Primera ley de termodinámica, Físico-química. McGraw-Hill Interamericana, México.
- Moreno F (2000). Energía, nutrición y dietética para tecnólogos de alimentos. Díaz de Santos, Madrid.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Muestra	Peso de muestra	Peso del agua	Longitud del alambre
Benzoico			
Aceite			
Harina			

Temperaturas	Ác. benzoico	Aceite	Harina
T_0			
T_1			
T_2			
T_3			
T_4			
T_5			
Δ_T			

COMENTARIOS



Digestión de nutrientes: amilasa salival

B. Marcos-Gómez y M. J. Moreno-Aliaga

INTRODUCCIÓN

Una de las funciones fundamentales del aparato digestivo es transformar los alimentos ingeridos en estructuras sencillas capaces de ser absorbidas a nivel intestinal.

La digestión de los carbohidratos ingeridos comienza en la boca a través de una enzima hidrolasa denominada amilasa salival (α -amilasa) o también conocida como ptialina o tialina (Fig. P2-1). Se produce principalmente en las glándulas salivares (sobre todo en las glándulas parótidas) y en el pán-

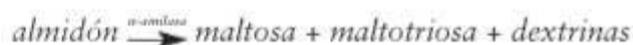


Figura P2-1. Estructura macromolecular de la amilasa salival humana.

creas y su función es la de digerir el glucógeno y el almidón para formar azúcares simples.

La α -amilasa es capaz de romper los enlaces α (1 \rightarrow 4) internos, pero no los α (1 \rightarrow 6) ni los α (1 \rightarrow 4) terminales ni próximos a las ramificaciones. Por tanto, los productos resultantes son maltosa y otros polímeros pequeños de glucosa, que contienen de 3 a 9 moléculas de ésta (maltotriosa y α -dextrinas límite, que son los productos ramificados de la molécula de almidón). Su pH óptimo de actuación está entre 6,7 y 7,0 y es activada por la presencia de iones cloruro.

Aunque el alimento permanece en la boca durante un corto período de tiempo, la acción de la amilasa salival continúa hasta que el pH ácido del contenido estomacal la inactiva, de manera que hasta este momento la enzima hidroliza de un 30 a un 40 % de los almidones de la dieta.



A nivel intestinal actúa otra amilasa de origen pancreático y con una actividad semejante a la salival, rindiendo productos de degradación similares. Estos productos sufren finalmente la acción de las disacaridasas del borde en cepillo de los enterocitos que liberan monosacáridos capaces de ser absorbidos.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es determinar cualitativamente la actividad de la α -amilasa salival.

PROCEDIMIENTO

Material y equipos

Muestras

- Saliva.

Equipos

- Baño termostático.
- Mechero.

Material

- Tubos de ensayo.
- Papel de filtro.
- Embudo.
- Pipetas.

Reactivos

- Solución de almidón al 0,5%.
- Solución de Lugol:
 - 16,6 g IK.
 - 1,25 g I₂.
 - c.s.p. 1.000 mL agua.
- Fehling A: 17,34 g SO₄Cu/100 mL agua.
- Fehling B:
 - 173 g tartrato sódico potásico.
 - 50 g NaOH.
 - c.s.p. 500 mL agua.

Fundamento

El almidón es el polisacárido de reserva más abundante en los vegetales. Está constituido por una mezcla de:

- α -amilosa (10-20%): una cadena lineal de unas 200 unidades de D-glucosa, unidas por enlaces α (1 \rightarrow 4).
- Amilopectina (80-90%): cadena lineal de D-glucosa con enlaces α (1 \rightarrow 4), con numerosas ramificaciones unidas a la cadena principal por enlaces α (1 \rightarrow 6).

La α -amilosa en agua presenta una ordenación espiral característica, con 6 o 7 residuos glucosilo por vuelta de espiral. En esta hélice los grupos hidroxilo quedan hacia fuera, mientras que en el interior se disponen los grupos hidrófo-

bos. En este interior es donde se incluye el yodo, formando un complejo de intenso color azul que permite la identificación positiva de trazas de almidón.

La amilasa salival o ptialina actúa sobre el almidón de los alimentos liberando azúcares reductores.

El poder reductor que pueden presentar los azúcares proviene de su grupo carbonilo, que puede ser oxidado a grupo carboxilo con agentes oxidantes suaves. Si el grupo carbonilo se encuentra combinado, no puede presentar este poder reductor.

Los azúcares reductores, en medio alcalino, son capaces de reducir el ión Cu²⁺ de color azul a Cu⁺ de color rojo. Para ello, el grupo carbonilo del azúcar se oxida a grupo carboxilo. En medio fuertemente básico, presencia de NaOH, el ión Cu²⁺ formaría Cu(OH)₂ insoluble, por ello se añade tartrato sódico potásico que actúa como estabilizador al formar un complejo con el Cu²⁺.

En consecuencia, se podrá demostrar la acción de la enzima amilasa salival sobre el almidón, comprobando que los productos resultantes de la acción enzimática son reductores y no dan la reacción del yodo.

Protocolo

1. Se colocan en una gradilla cuatro tubos de ensayo y se numeran adecuadamente (I, II, III, IV), tras lo cual se añaden 2 mL de la solución de almidón al 0,5% a cada uno de ellos.
2. Al tubo número I se le añade una gota de solución diluida de Lugol (una parte de Lugol y dos de agua) y se anota el resultado.
3. Al tubo número II se le añade 1 mL de solución de Fehling A y otro de Fehling B, y tras calentar en el mechero se anota el resultado observado.
4. A los tubos III y IV se les añade una pequeña cantidad de saliva. Para ello, tras enjuagar la boca, se mastica un trozo de papel de filtro para estimular la salivación. Los líquidos segregados se vierten a un embudo con un filtro humedecido colocado sobre los tubos de ensayo III y IV. Tras ello, dichos tubos se incuban durante 15-20 minutos en un baño entre 35-40 °C. Transcurrido este tiempo se sacan del baño y se dejan enfriar. A continuación,

al tubo III se le añaden unas 3 o 4 gotas de solución diluida de Lugol y se observa el resultado. Por otra parte al tubo IV se le añade 1 mL de solución de Fehling A y otro de B, y tras calentar a la llama se anota el resultado observado.

Interpretación de los resultados

La hidrólisis del almidón por la α -amilasa salival queda demostrada cuando la prueba de iden-

tificación del almidón con la solución de Lugol pasa a ser negativa, mientras que la prueba de Fehling pasa a ser positiva, indicando la aparición de azúcares reductores.

BIBLIOGRAFÍA

- Cox MM, Nelson DL (2009). *Lehninger: principios de bioquímica* (5.ª ed). Omega, Barcelona.
 Guyton AC, Hall JE (2006). *Tratado de Fisiología Médica* (11.ª ed). McGraw-Hill Interamericana, Madrid.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

	Prueba de Lugol		Prueba de Fehling	
	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
Tubo I:				
Tubo II:				
Tubo III:				
Tubo IV:				



COMENTARIOS

Absorción intestinal de azúcares

C. Fanjul González y M. P. Lostao Crespo

INTRODUCCIÓN

La absorción intestinal de los nutrientes que proceden de los alimentos se lleva a cabo mediante una serie de mecanismos que permiten el paso selectivo de los distintos solutos desde la luz intestinal hacia la sangre.

La principal vía de absorción de nutrientes es la transcelular, estando implicadas varias proteínas transportadoras localizadas en las membranas apical y basolateral de los enterocitos. Los diversos transportadores se diferencian en su dependencia del Na^+ o H^+ , selectividad por sustrato y características cinéticas.

El paso de la glucosa y galactosa desde la luz intestinal hasta la sangre incluye al menos dos componentes de transporte, un transporte saturable y activo (transportador Na^+ -glucosa, SGLT1) y otro lineal pasivo ya que, a altas concentraciones de sustrato, el transporte no podría ser explicado sólo por la actividad de SGLT1, ya que al ser de alta afinidad y baja capacidad, el transportador se encontraría saturado. No obstante, de forma habitual la absorción de glucosa y galactosa requiere un transporte activo que supone la unión de dos moléculas de Na^+ por cada molécula de glucosa. El transportador los introduce en la célula utilizando el gradiente electroquímico de sodio, que es mantenido por la bomba $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{ATPasa}$, localizada en la membrana basolateral de los enterocitos. La salida hacia la sangre de estos azúcares se da a favor de gradientes de concentración mediante el transportador facilitativo GLUT2.

Los métodos experimentales para el estudio de la absorción intestinal incluyen tanto técnicas

in vitro (sacos intestinales evertidos de Wilson-Wiseman, anillos de intestino evertidos de Crane-Mandelstam, utilización de preparaciones de enterocitos aislados, de vesículas de membrana apical o basolateral, etc.), como técnicas *in vivo*. Esta última técnica, que será la que describiremos a continuación, está encaminada a mantener las condiciones del animal lo más próximas a las fisiológicas a lo largo del experimento, a fin de obtener datos que respondan lo más fielmente posible a la realidad. Consiste en el estudio de la absorción de un sustrato por un segmento de intestino, aislado mediante una cánula de entrada y otra de salida, por el que se bombea la solución de estudio.

OBJETIVO

El objetivo de la práctica es el estudio de la absorción intestinal de glucosa en yeyuno de rata *in vivo* y su inhibición por la florricina, inhibidor del transportador SGLT1 de alta afinidad, que compete con el azúcar por su lugar de unión al transportador.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Se perfunde una solución fisiológica con el azúcar a estudiar por un asa intestinal seleccionada al efecto. La desaparición de dicho azúcar perfundido refleja la absorción de que ha sido objeto por parte del intestino.

Material y equipos

Animales de experimentación

- Rata en ayunas.

Material

- Material quirúrgico e hilo.
- Cánulas.
- Placa de Petri.
- Pinzas de cocodrilo y de Pean.
- Tablillas de disección.
- Esparadrapo.
- Jeringa de 10 mL.
- Pipetas de 10 y 1 mL.
- Pie, pinza y nuez.
- Vasos de precipitado.
- Matraces aforados de 100 mL.
- Gradilla con 12 tubos.

Reactivos

- Anestésico: clorhidrato de metedomidina (DOMTOR®, Pfizer) y ketamina (IMALGENE 500®, Merial). En una proporción 1:4, a una dosis de 0,5 mL de la mezcla por cada 200 g de peso.
- Solución de glucosa 2 mM en suero fisiológico.
- Solución de glucosa 2 mM y florizina 5×10^{-4} M en suero fisiológico.
- NaCl 0,9% (suero fisiológico).
- Reactivo de Somogyi (c.s.p. 1.000 mL):
 - 4 g $\text{SO}_4 \text{Cu} 5 \text{H}_2\text{O}$.
 - 24 g $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ anhidro.
 - 16 g $\text{CO}_3 \text{HNa}$.
 - 12 g tartrato sódico-potásico.
 - 180 g $\text{SO}_4 \text{Na}_2 \text{IO} \text{H}_2\text{O}$.
- Reactivo de Nelson (c.s.p. 1.000 mL):
 - 50 g molibdato amónico.
 - 42 cc $\text{SO}_4 \text{H}_2$.
 - 6 g $\text{AsO}_4 \text{HNa}_2 7\text{H}_2\text{O}$.

Protocolo

1. Se anestesia al animal mediante inyección intramuscular. Una vez anestesiado, se sitúa sobre la tablilla de disección, fijándolo por las extremidades mediante esparadrapo, de modo que quede expuesto el abdomen. A continuación, se practica una laparatomía, operación

que consiste en abrir el abdomen por su línea media. Para ello se realiza un corte longitudinal en la piel de unos 3 cm, y se practica una incisión de unos 2 cm en la pared abdominal siguiendo la línea alba, lo que permite visualizar las asas intestinales.

Humedecidos los dedos índice y pulgar de ambas manos con suero fisiológico, se identifica el principio del yeyuno (la región duodenal del intestino forma un asa situada en torno a la región gástrica) y se selecciona una longitud de yeyuno de unos 20 cm pasando una ligadura en ambos extremos, que se deja sin cerrar. A continuación, se ligan distalmente los vasos sanguíneos que irrigan dichos extremos para evitar hemorragias (Fig. P3-1). Mediante unas tijeras finas se da un corte parcial y oblicuo (en pico de flauta) en el extremo inicial del asa aislada, por la zona menos vascularizada.

2. Seguidamente se introduce dentro del intestino una cánula de entrada que se asegura mediante la ligadura proximal y queda orientada en el sentido distal. Se hace lo mismo en el extremo distal del asa seleccionada, colocando la cánula en sentido contrario (Fig. P3-1). Queda así aislada un asa intestinal con una cánula de entrada y otra de salida. Se introduce el asa cuidadosamente en la cavidad abdominal, la cual se cierra con la pinza de cocodrilo, y se cubre con una gasa humedecida con suero fisiológico, dejando asomar las cánulas.
3. La cánula de entrada se conecta mediante un tubo de goma a una jeringa que se mantiene vertical por medio de un soporte (pie). La cánula de salida se conecta con otro tubo (Fig. P3-2). Para limpiar el asa intestinal, se van introduciendo por la jeringa unos 25 mL de suero fisiológico a 37 °C hasta que se observa que el líquido de salida, que se recoge en un vaso de precipitado, fluye regularmente y es totalmente transparente. Ello indica que no se han formado burbujas de aire dentro del asa (que deben evitarse) y que el lavado del intestino ha sido suficiente.
4. A continuación, se deja caer la columna de líquido de la jeringa y, cuando su menisco alcanza la marca 1mL de la jeringa, se pinza la cánula de salida asegurándose de que la columna líquida no descienda (Fig. P3-2).
5. Se dejan transcurrir 10 minutos en esa situación antes de empezar las absorciones sucesivas, a fin de estabilizar el intestino con el suero



Figura P3-1. Canulación del asa de intestino seleccionada. Izquierda: ligaduras de los vasos sanguíneos. Derecha: ligaduras para sujetar las cánulas.

fisiológico. Debe controlarse que la temperatura rectal del animal se mantenga a 37 °C, abrigándolo o utilizando una lámpara, si fuera necesario.

6. Transcurridos los 10 minutos, se acopla un matraz de 100 mL a la cánula de salida y en la jeringa, utilizando una pipeta, se introducen 10 mL exactos de suero fisiológico a 37 °C con glucosa 2 mM. A continuación, se abre la cánula de salida y se deja que la solución entre en el intestino hasta que el nivel de la columna líquida de la jeringa quede al nivel de 1 mL, momento en el que se cierra de nuevo la cánula de salida. Durante esta operación, el efluente se recoge en el matraz que recibe el tubo de salida y se esperan 10 minutos. Ahora el intestino contiene glucosa, disuelta en suero fisiológico, que se va a absorber.
7. Terminado este período de absorción, se añade suero fisiológico a 37 °C a la jeringa, se abre la cánula de salida y se hace pasar un total de unos 30 mL de suero fisiológico, sin quitar el matraz, para asegurarse de que toda la glucosa del asa intestinal ha sido arrastrada. De nuevo, se enrasa la jeringa a 1 mL, se cierra la cánula de salida, se retira el matraz y se sustituye por otro matraz limpio para la segunda absorción. Para esta segunda absorción se añaden 10 mL de la solución fisiológica con glucosa 2 mM que contiene también florricina 5×10^{-4} M, y se procede de la manera descrita para el anterior período de absorción.
8. Terminado el experimento, los matraces utilizados, que contienen el líquido que ha llenado el asa intestinal durante ambos períodos de absorción, se enrasan a 100 mL con agua destilada y se agitan. Posteriormente, se separa del cuerpo el asa intestinal con sus dos cánulas, cortando el intestino proximal y distalmente a ellas, para medir

su longitud. Esta medida debe realizarse de modo que el asa quede suspendida en el aire. Se sujeta por una de las cánulas soportando el peso de una pinza de Pean colocada en el otro extremo, y con ayuda de una regla se mide la longitud del intestino. El valor obtenido se multiplica por 0,6 para obtener con buena aproximación la longitud real del asa en el animal *in situ*.

9. A continuación, se procede a la valoración del azúcar mediante el método de Nelson-Somogyi, realizando todas las determinaciones por duplicado.

La glucosa es un azúcar reductor de manera que reduce en caliente el Cu^{++} a Cu^+ . Este Cu^+ es inestable y se transforma en Cu_2O . Al añadir reactivo de Nelson (que forma complejos con el Cu^+) se obtiene una coloración verdosa cuya intensidad es proporcional a la concentración de glucosa.



Figura P3-2. Dispositivo experimental para los estudios de absorción intestinal.

Partiendo de la solución de azúcar utilizada, de concentración 2 mM, se hacen los siguientes tipos de patrones:

- I. 6 mL de glucosa 2 mM y H₂O hasta 100 mL (solución 0,12 mM)
 - II. 8 mL de glucosa 2 mM y H₂O hasta 100 mL (solución 0,16 mM)
 - III. 10 mL de glucosa 2 mM y H₂O hasta 100 mL (solución 0,2 mM)
10. Se agitan bien los matraces correspondientes. Con una pipeta de 10 mL se llevan a tubos de ensayo alícuotas de 1 mL, por duplicado, tanto de los matraces con las diluciones patrones, como de cada uno de los matraces en los que se ha recogido la solución que ha pasado por el intestino. En un tubo vacío, que servirá de blanco, se añade 1 mL de agua destilada.
 11. A continuación, a cada tubo se le añade 1 mL de reactivo de Somogyi y se colocan todos los tubos, incluyendo el blanco, en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos.
 12. Transcurrido ese tiempo, se sacan los tubos del baño y se colocan en un baño de agua fría durante 5 minutos. Después se añade a cada tubo 1 mL de reactivo de Nelson y se agitan hasta que desaparezca la efervescencia. Luego se adicionan 10 mL de agua destilada y se agitan los tubos por inversión. Por último, se determina la absorbancia del color de cada tubo utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 610 nm.

Cálculos

Los patrones I, II y III contienen 12 μ moles, 16 μ moles y 20 μ moles de glucosa por 100 mL, respectivamente.

En un papel milimetrado se sitúan en abscisas los μ moles de glucosa y en ordenadas las absorbancias leídas en el colorímetro (media de los duplicados para las soluciones tipo correspondientes), lo que permite trazar la recta patrón.

Las lecturas de las soluciones problema, por extrapolación en la recta patrón obtenida, permiten conocer la cantidad de azúcar contenida en los correspondientes matraces de 100 mL, que es precisamente la que no ha sido absorbida por el intestino.

La cantidad de azúcar absorbida por el intestino será la diferencia entre la cantidad total de azúcar que había en los 10 mL de solución inicial perfundida por el intestino (20 μ mol) y la que ha quedado en la solución tras la absorción.

La absorción se expresa en:

$$\mu\text{mol absorbido/cm/min} = \frac{\mu\text{mol inicial} - \mu\text{mol final}}{\text{longitud (cm)} \times 10 \text{ min}}$$

BIBLIOGRAFÍA

- Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ and Leturque A (2008). Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu Rev Nutr* 28:35-54.
- Lostao MP, Berjón A, Barber A and Ponz F (1991). On the multiplicity of glucose analogues transport systems in rat intestine. *Rev Esp Fisiol* 47:209-216.
- Sols AL and Ponz F (1946). Nueva técnica para el estudio de la absorción intestinal y datos para la mejor interpretación del mecanismo de la absorción selectiva de glúcidos. *Rev Esp Fisiol* 2:283-284.
- Wright EM, Hirayama BA and Loo DF (2007). Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med* 261:32-43.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Observar la diferencia entre la cantidad de azúcar que el intestino ha absorbido en ausencia y presencia de florricina. Expresar el efecto inhibitor debido a dicha sustancia en porcentaje (% absorción).

Comentar los resultados obtenidos y posibles incidencias en la realización de la práctica.



COMENTARIOS

A large, empty rectangular area with a light blue gradient background, intended for the user to write their comments or observations.

Determinación del índice glucémico de los alimentos

I. Díez López y M. T. Macarulla Arenaza

INTRODUCCIÓN

La ingestión de los distintos alimentos que contienen carbohidratos provoca efectos diferentes en la respuesta glucémica, es decir, en el grado en el que se eleva la concentración de la glucosa sanguínea tras su consumo y en el tiempo que transcurre hasta volver a alcanzar los niveles basales. Para cuantificar esta respuesta, Jenkins y col. (1981) diseñaron el **Índice glucémico** (IG, o GI por *Glycemic Index*).

El IG de un alimento se define como “el área bajo la curva del incremento de glucemia durante un período de tiempo tras la ingesta de ese alimento (normalmente 2 h), comparada con la respuesta a una cantidad equivalente de hidratos de carbono en un alimento estándar (normalmente pan blanco) o glucosa”, y se expresa en porcentaje. Por tanto, cuanto mayor sea el IG, mayor y más rápido será el aumento de glucemia tras la ingestión de ese alimento y viceversa.

El IG no depende de la cantidad de carbohidratos del alimento, sino de la velocidad a la que se digieran y absorban, lo que a su vez depende de la forma química de éstos (complejos *vs* sencillos, relación amilosa/amilopectina del almidón), contenido en fibra (cantidad y tipo), contenido en proteínas y grasa, tamaño de partícula, grado de gelatinización del almidón, procesado térmico, etc.

Según este índice, los alimentos se clasifican en “alimentos de IG bajo” ($\leq 55\%$), “medio” (56-69%) o “alto” ($\geq 70\%$). Esta clasificación es útil para elegir preferentemente alimentos con IG bajo como fuente de carbohidratos en el diseño de dietas para diabéticos, pero también se emplea con otros fines (tratamiento de la obesidad, actividad

deportiva, etc.), e incluso está en estudio su aplicación en la prevención de ciertas enfermedades como la cardiopatía coronaria.

Sin embargo, el IG no es el único factor que determina hasta qué punto el consumo de un alimento eleva la glucemia, puesto que también influye la cantidad de carbohidratos aportados. Por ello, para el diseño de dietas es más útil el concepto de **Carga glucémica** (CG, o GL por *Glycemic Load*), que se refiere a una porción concreta de alimento y se obtiene al multiplicar el IG del alimento por la cantidad de carbohidratos disponibles en dicha porción, dividido por 100. Por tanto, el concepto de CG implica tanto la calidad como la cantidad de los hidratos de carbono.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es determinar las diferentes respuestas glucémicas a la ingesta de distintos alimentos ricos en hidratos de carbono y calcular sus respectivos índices glucémicos.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Tras la ingesta de un alimento, la digestión y absorción de sus carbohidratos provoca el incremento de la glucemia hasta el momento en que se ve contrarrestado por la insulina segregada por el páncreas. La medición seriada de la glucemia postprandial tras dicha ingesta, comparada con el incremento de glucemia inducido por la ingesta de

una cantidad de glucosa equivalente, permite calcular el índice glucémico de dicho alimento.

Material y equipos

Material

- Balanza.
- Agitador.
- Vasos de precipitados.
- Glucómetros y tiras reactivas de glucosa.
- Dispositivos de punción y lancetas.
- Tablas de composición de alimentos.

Reactivos

- Glucosa.
- Alimentos ricos en hidratos de carbono.

Protocolo

1. Se seleccionan varios voluntarios sanos que deben estar en ayuno previo de 10-12 h, no haber realizado una actividad física intensa el día anterior y permanecer en reposo durante todo el estudio, y se distribuyen en tres grupos: G (glucosa), A1 (alimento 1) y A2 (alimento 2).
2. Se les mide a todos ellos la glucemia basal (G_0) siguiendo las instrucciones de los glucómetros.
3. Utilizando las tablas de composición de alimentos, y teniendo en cuenta la porción comestible y el contenido en carbohidratos, se calcula la cantidad de cada alimento en estudio que aporte 50 g de carbohidratos.
4. Los individuos del grupo G ingieren 50 g de glucosa disueltos en 300 mL de agua, mientras que los de los grupos A1 y A2 ingieren las cantidades de alimento calculadas, acompañadas de 300 mL de agua.
5. Se mide la glucemia de cada individuo a diferentes tiempos (15, 30, 45, 60, 90 y 120 min), y se traza en papel milimetrado su curva de glucemia (tiempo en abscisas y glucemia en ordenadas).

Cálculos

Para cada individuo se calcula el incremento de glucemia de cada muestra (DG_t) restandole el valor de la glucemia basal: $DG_t = G_t - G_0$.

Para cada uno de ellos se calcula el Área bajo la curva (AUC, por *Area Under the Curve*) siguiendo el método trapezoidal (Fig. P4-1).

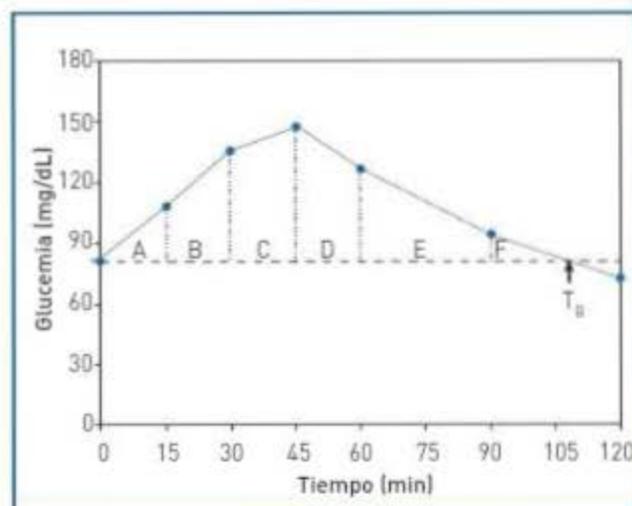


Figura P4-1.

El AUC es igual a la suma de las áreas de los triángulos y trapezoidos delimitados por la curva de glucemia y la glucemia basal (G_0), por tanto, $AUC = A + B + C + D + E + F$, donde:

$$\begin{aligned}
 A &= \Delta G_{15} \times 15/2 & B &= (\Delta G_{15} + \Delta G_{30}) \times 15/2 \\
 C &= (\Delta G_{30} + \Delta G_{45}) \times 15/2 & D &= (\Delta G_{45} + \Delta G_{60}) \times 15/2 \\
 E &= (\Delta G_{60} + \Delta G_{90}) \times 30/2 & F &= \Delta G_{90} \times T_B/2
 \end{aligned}$$

siendo T_B el tiempo transcurrido entre el último valor de $\Delta G > 0$ y el momento en el que la curva de glucemia se cruza con el valor basal G_0 . Si no se cruzan, es decir, si $\Delta G_{120} > 0$, F no será un triángulo sino un trapezoido, luego su área será $(\Delta G_{90} + \Delta G_{120}) \times 30/2$.

Se calculan las AUC medias de cada grupo (AUC_G , AUC_{A1} y AUC_{A2}).

El IG de cada alimento se calcula aplicando la fórmula:

$$IG (\%) = (AUC_A / AUC_G) \times 100$$

Sabiendo el tamaño de la ración habitual (g) de los alimentos utilizados, se puede calcular la cantidad de carbohidratos disponibles en la misma (g), y con ella su carga glucémica aplicando la fórmula:

$$CG = IG \times \text{carbohidratos por ración} / 100$$

BIBLIOGRAFÍA

Atkinson FS, Foster-Powell K, Brand-Miller JC (2008). International tables of glycemic index and glycemic load values: 2008. *Diabetes Care* 31: 2281-2283.

Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, Bowling AC, Newman HC, Jenkins AL, Goff DV (1981). Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr* 34:362-366.

Morciras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C (2009). Tablas de composición de alimentos (13.ª ed. Grupo Anaya, Madrid).

Wolever TM (2004). Effect of blood sampling schedule and method of calculating the area under the curve on validity and precision of glycaemic index values. *Br J Nutr* 91:295-301.

World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization (FAO) (1998). Carbohydrates in human nutrition. Food and Nutrition paper n.º 66, chapter 4. Roma.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Tiempo [min]	Glucosa		Alimento 1		Alimento 2	
	G [mg/dL]	ΔG [mg/dL]	G [mg/dL]	ΔG [mg/dL]	G [mg/dL]	ΔG [mg/dL]
0						
15						
30						
45						
60						
90						
120						
AUC [mg/dL × min]						

	Alimento 1	Alimento 2
Índice glucémico (%)		
Clasificación (alto/medio/bajo)		
Ración habitual (g)		
Carbohidratos por ración habitual (g)		
Carga glucémica		



COMENTARIOS

A large, empty light blue rectangular area intended for writing comments.

Valoración del gluten en los alimentos

E. Simón Magro

INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca (EC) consiste en una intolerancia a las proteínas del gluten presente en los cereales trigo, centeno, cebada, avena y sus variedades (triticale –híbrido de trigo y centeno–, kamut, espelta) que cursa con una atrofia severa de la mucosa del intestino delgado superior. Dicha atrofia produce una malabsorción de macro y micronutrientes, cuya repercusión clínica depende de la edad y la situación fisiopatológica del paciente. Esta intolerancia es de carácter permanente, es decir, se mantiene a lo largo de toda la vida y aparece en sujetos genéticamente predispuestos a padecerla.

El gluten es la fracción de proteínas de los cereales que es insoluble en agua y en soluciones salinas. Contiene dos fracciones proteicas: gluteninas y prolaminas y se acepta que la fracción tóxica del gluten para los individuos celíacos son las prolaminas, que constituyen aproximadamente el 50% de la composición del gluten. El enfermo celíaco es sensible, por tanto, a las prolaminas del trigo (gliadinas), centeno (secalinas), cebada (hordeínas), y probablemente, avena (aveninas). Diversos estudios han puesto en entredicho la toxicidad de la avena, aunque aún no se dispone de estudios concluyentes.

El único tratamiento para la EC es la eliminación del gluten de la dieta, consiguiendo así una remisión total de los síntomas. Es necesario tener en cuenta que este compuesto se utiliza muy habitualmente en la industria alimentaria y que aparece en el etiquetado bajo diversos ingredientes como, por ejemplo, sémola, proteína vegetal, extracto de malta, levadura, especias, aromas, amiláceos, fibra o espesante. De este modo, alimentos que natural-

mente son libres de gluten, como pueden ser carnes, lácteos o pescados, por ejemplo, pueden presentar cantidades significativas de esta prolamina.

Para poder llevar a cabo un cumplimiento de una dieta sin gluten (DSG) se debe tener en cuenta la clasificación general de alimentos según su contenido en gluten ([Tabla P5-1](#)). En relación al etiquetado, el reglamento europeo (Reglamento CE 41/2009) indica que los productos alimenticios destinados a la población celíaca podrán denominarse “productos exentos de gluten” cuando contengan menos de 20 mg/kg o ppm y, “productos de contenido muy reducido de gluten” para aquellos que tengan menos de 100 mg/kg o ppm.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es evaluar el contenido en gluten en productos alimenticios que, por su etiquetado nutricional, composición y/u origen, se consideran exentos o de contenido muy reducido en gluten.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Para la realización de esta técnica de **inmunoensayo enzimático tipo sándwich de doble anticuerpo** se puede utilizar el kit basado en la utilización del anticuerpo monoclonal R5 que permite la detección simultánea de las gliadinas, secalinas y hordeínas (las proteínas del gluten del trigo, cebada y centeno respectivamente, solubles en alcohol) de

Tabla P5-1. CLASIFICACIÓN DE ALIMENTOS ATENDIENDO A SU CONTENIDO EN GLUTEN

Alimentos libres de gluten	Alimentos que pueden contener gluten	Alimentos que contienen gluten
<p>Características de estos grupos de alimentos</p> <p>Aquéllos que por naturaleza no contienen gluten</p>	<p>Aquéllos que por naturaleza no contienen gluten, pero pueden incorporarlo por el proceso tecnológico o por contaminación cruzada</p>	<p>Aquellos productos elaborados a partir de los cereales prohibidos para los celíacos</p>
<p>Tipos de alimentos incluidos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Leche y derivados: quesos, requesón, nata, yogures naturales, cuajada - Todo tipo de carnes y vísceras frescas, congeladas y en conserva al natural - Embutidos: cecina, jamón serrano y jamón cocido de calidad extra - Pescados sin rebozar, mariscos y las conservas al natural o en aceite - Huevos - Verduras, hortalizas y tubérculos - Legumbres. Frutas - Arroz, maíz, tapioca y sus derivados - Azúcar y miel - Aceites y mantequillas - Café, infusiones y refrescos de naranja, limón y cola - Vinos, bebidas espumosas - Frutos secos crudos - Sal, vinagre de vino, especias en rama, en grano y todas las naturales 	<ul style="list-style-type: none"> - Embutidos: choped, mortadela, chorizo, morcilla, salchichas, etcétera - Patés - Quesos fundidos, de untar de sabores, especiales para pizzas - Conservas de carne, albóndigas, hamburguesas - Conservas de pescado en salsa, con tomate frito - Salsas, condimentos y colorantes alimentarios - Sucedáneos de café, chocolate y cacao y otras bebidas de máquina - Frutos secos tostados o fritos con harina y sal - Caramelos y golosinas - Algunos tipos de helados - Sucedáneos de chocolate 	<ul style="list-style-type: none"> - Pan, harina de trigo, cebada, centeno - Bollos, pasteles y tartas - Galletas, bizcochos y productos de repostería - Pasta alimenticia: fideos, macarrones, tallarines, etc. - Higos secos - Bebidas destiladas o fermentadas a partir de cereales: cerveza, agua cebada - Productos manufacturados en los que entre en su composición cualquiera de las harinas ya citadas y en cualquiera de sus formas: almidones, féculas, sémolas, proteínas - Obleas de la comunión

alimentos. Consta de 96 pocillos distribuidos en 12 tiras de 8 pocillos cada una, y cada pocillo está tapizado con un anticuerpo antiprolamina. Como patrón de las prolaminas se emplea la gliadina y se estima que las prolaminas corresponden al 50% de las proteínas que componen el gluten. El límite de cuantificación del kit es de 3,1 mg/kg de gluten.

Antes del inicio del análisis se debe contar con todo el material fungible y equipos necesarios para su realización.

Asimismo, antes de manejar los reactivos y las muestras a ensayar, para evitar riesgos de conta-

minación, el analista se deberá limpiar las manos con agua y jabón. A continuación limpiará la poyata del laboratorio con solución hidroalcohólica (etanol al 60-80%, aproximadamente).

Material y equipos

Material

- Los reactivos del kit así como las tiras con los pocillos necesarios para la realización del análisis

se mantendrán a temperatura ambiente al menos 30 minutos antes de su utilización (Tabla P5-2).

- Etanol absoluto PA (Panreac 121086).
- Agua destilada.
- Frasco lavador, probetas, envases de vidrio con tapón de rosca y material de vidrio.
- Tubos de polipropileno de 10 mL con y sin tapa.
- Espátulas, cuchillos, tijeras, mortero con maza.
- Papel absorbente.

Equipos

- Balanza analítica.
- Micropipetas de rango variable (50-250 uL y 100-1.000 uL) y una micropipeta multicanal.
- Lector ELISA.
- Picadora u homogenizador de alimentos.
- Baño termostático.
- Centrífuga.
- Vortex.

Reactivos

Deben prepararse diariamente antes de su utilización los siguientes reactivos:

- Etanol al 80% cada día de análisis: por cada 100 mL de solución hidroalcohólica a preparar, se deben añadir 80 mL de etanol absoluto y completar con agua destilada.
- Solución de lavado incluida en el kit Ingezim Gluten se debe diluir 25 veces, es decir, diluir un volumen de solución concentrada en 24 volúmenes de agua destilada.
- Diluyente para las muestras incluido en el kit Ingezim Gluten se debe diluir un volumen de solución concentrada en 4 volúmenes de agua destilada.

Protocolo

Para la determinación del contenido en gluten de alimentos, el método analítico más extendido que, además, es el recomendado por la AOAC (AOAC 979.09) y por el Codex Alimentario (ALI-NORM 08/31/26-Apéndice III), es la técnica de ELISA o enzimo inmunoanálisis. Se recomienda el uso del anticuerpo monoclonal R5 de Méndez, que reconoce el epítipo QQFPF, secuencia ami-

Tabla P5-2. COMPONENTES DEL KIT INGEZIM GLUTEN (3.0.GLU.K2)

Reactivo	Tipo de preparación
Placas de microtitulación (8 × 12 pocillos) recubierta con el AcM antigliadinas, secalinas y hordeínas	Listas para su uso
Control positivo y negativo de gliadina	Listos para su uso
Estándar europeo de gliadina a las concentraciones: 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,25 ng/mL, 3,12 ng/mL y 1,56 ng/mL	Listos para su uso
AcM antigliadinas, secalinas y hordeínas conjugado con peroxidasa	Listo para su uso
Tampón de extracción	Listo para su uso
Solución de lavado	Diluir con agua destilada 1:25
Diluyente	Diluir con agua destilada 1:5
Sustrato (TMB)	Listo para su uso
Solución de frenado (H ₂ SO ₄ , 0,5 M)	Lista para su uso

noácida muy repetida en las proteínas de los cereales prohibidos para el celíaco.

Identificación de las muestras

En el cuaderno de laboratorio deberá apuntarse la relación de muestras a analizar de forma que aparezcan codificadas con un número (del 1 al 42, como máximo). Este número se empleará para rotular los tubos del ensayo, diseño de la placa y lectura e interpretación de los resultados. Esta etapa así como la de preparación de las muestras se realiza en una zona separada de la zona de análisis, para evitar riesgos de contaminación.

Preparación de las muestras

Se debe conseguir una muestra homogénea y representativa del producto a analizar. Para obtener una homogeneización adecuada, se siguen diferentes tratamientos en función de la matriz y consistencia del producto.

Extracción del gluten de la muestra

Se pesan 0,25 gramos de muestra de alimento molido o triturado en un tubo de polipropileno,

se añaden al tubo 2,5 mL del tampón de extracción y se mezcla en el vortex durante 10-20 segundos.

Seguidamente, los tubos se incuban a 50 °C en el baño termostático durante 40 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añaden 7,5 mL de etanol al 80%, se vortea durante 30-40 segundos y, seguidamente, se incuban 1 hora en el baño termostático a temperatura ambiente con agitación suave.

A continuación, se centrifugan los tubos a 2.500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C). Tras la centrifugación, las dos fases, sólido y líquido, deben estar bien separadas.

El sobrenadante obtenido de la centrifugación de las muestras se utiliza para su análisis mediante el método ELISA. Para ello, se toma una alícuota del sobrenadante que se pasa a tubos limpios de polipropileno y se diluye 1/50, empleando el diluyente incluido en el kit y siguiendo la siguiente forma de dilución: 50 µL de sobrenadante + 2.450 µL de diluyente.

Ensayo inmunoenzimático de las muestras

Antes de comenzar el ensayo, se debe confirmar que los reactivos se han equilibrado a temperatura ambiente durante, al menos, 30 minutos y que se han preparado las soluciones de lavado y de diluyente. Asimismo, se diseña la distribución de los estándares de gliadina y muestras siguiendo el siguiente esquema (Tabla P5-3):

EJEMPLOS DE TIPOS DE HOMOGENEIZACIONES



- **Productos de consistencia media** (cárnicos, productos de panadería y pastelería o similar) o dura (pastas alimenticias, frutos secos o similares): se selecciona una porción representativa del producto y se homogeniza en la picadora de alimentos.
- **Productos de consistencia dura o gomosa** (por ejemplo, caramelos, gominolas, píldoras): se trocean en un mortero utilizando la maza o con una tijera hasta conseguir pequeñas fracciones de producto.
- **Productos líquidos y de baja consistencia** (derivados lácteos o untables): se agita y/o remueve vigorosamente el producto antes de coger la muestra.
- **Harinas y productos en polvo**: se remueve con una espátula antes de coger la muestra.

Tabla P5-3. DISTRIBUCIÓN DE LOS CONTROLES, PATRONES Y MUESTRAS EN LA PLACA

	1	2	3	4	5	6
A	C+	C-	M3	M3	
B	1,56	1,56	M4	M4	...	
C	3,12	3,12	M5	M5	...	
D	6,25	6,25	M6	M6	...	
E	12,5	12,5	M7	M7		
F	25	25	M8	M8		
G	M1	M1	M9	M9		
H	M2	M2	M10	M10		

Se comienza dispensando los estándares o patrones de gliadina y controles en los pocillos de la placa ELISA. Se añaden 100 μL de control positivo y control negativo en los pocillos A1 y A2 respectivamente y el mismo volumen de 5 concentraciones del estándar de gliadina europeo (25; 12,5; 6,25; 3,12 y 1,56 ng/mL) por replicado en orden ascendente. Igualmente, se añaden en el resto de pocillos 100 μL de cada una de las muestras (M1, M2, M3, etc.) diluidas al 1/50.

Entonces, se incuba la placa 1 hora a temperatura ambiente protegida de la luz. Trascorrido ese tiempo, se vuelca rápidamente la placa en el fregadero para vaciar su contenido, evitando así la transferencia de contenido entre pocillos.

A continuación, se lava la placa con la solución de lavado añadiendo a cada pocillo un volumen superior a 350 μL , se agita ligeramente y se vacía su contenido rápidamente. Se golpea la placa boca abajo sobre una capa de papel absorbente hasta eliminar toda la solución de lavado. Este proceso se debe repetir cinco veces en total.

Antes de eliminar el contenido del último lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente, puesto que no debe mantenerse la placa en seco. A continuación, se añaden 100 μL del anticuerpo monoclonal (AcM) conjugado en cada pocillo utilizando la pipeta

multicanal y se incuba una hora a temperatura ambiente (20-25 $^{\circ}\text{C}$) protegida de la luz.

Entonces, se lava de nuevo cinco veces según procedimiento descrito y se añaden 100 μL de sustrato TMB por pocillo, manteniendo la reacción 10 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos que contengan gluten se tornan en color azulado.

Por último, para finalizar la reacción, se añaden 100 μL de solución de frenado, siguiendo el mismo orden en el que se añadió el sustrato. La solución de los pocillos se torna amarilla.

La lectura de la placa se realiza a una absorbancia de 450 nm en un lector ELISA. El test se considera válido cuando la absorbancia del control positivo sea superior al punto del patrón 25 ng/mL y el control negativo sea inferior al punto del patrón de 1,56 ng/mL.

Cálculos

Se recogen los datos obtenidos del lector ELISA en una hoja Excel, y a partir de los valores de absorbancia (que se sitúan en el eje de abscisas, x) y de los estándares de gliadina (que se sitúan en el eje de ordenadas, y), se obtiene una curva patrón que se corresponde con una función polinomial de segundo grado y se presenta en un gráfico (Fig. P5-1).

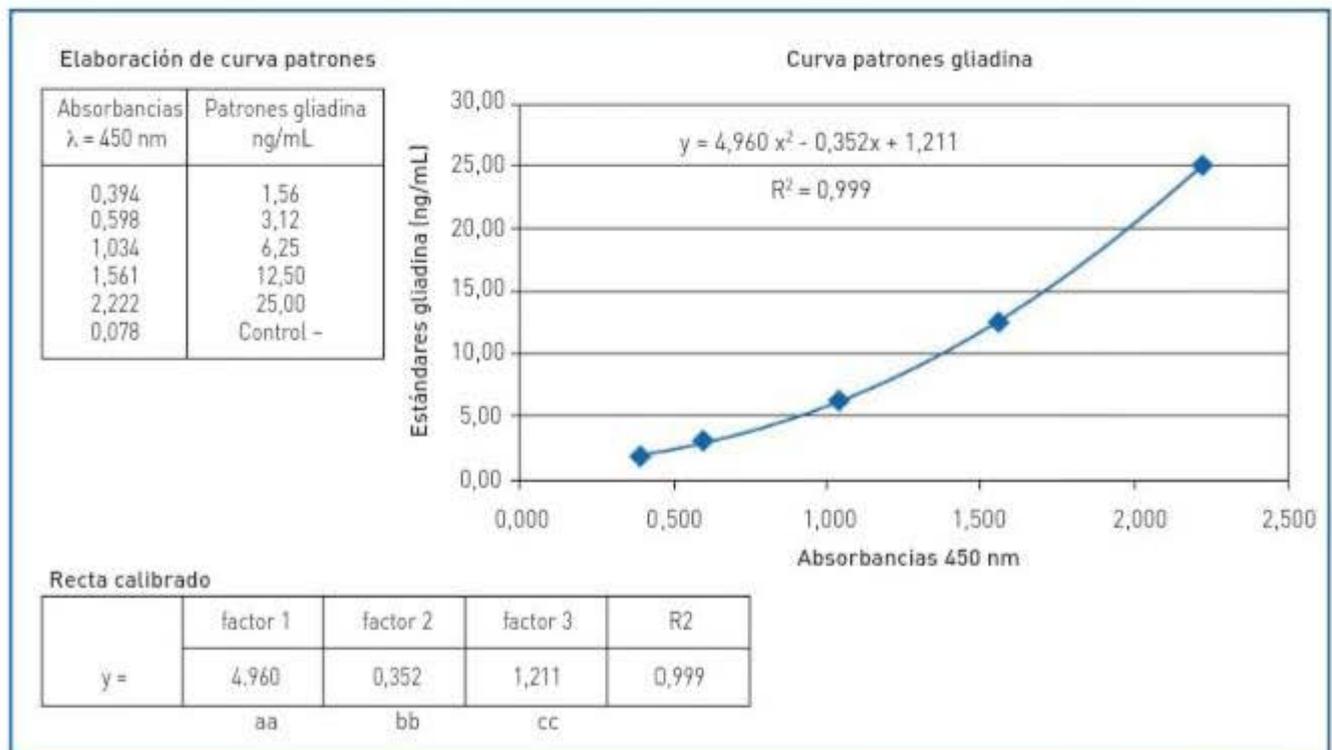


Figura P5-1. Ejemplo de resultados de curva de calibrado de estándares de gliadina.

Los valores de la curva obtenida tendrán los siguientes componentes:

$$y = aa \times x^2 + bb \times x + cc,$$

además del dato de coeficiente de correlación R^2 .

Sustituyendo los valores de absorbancia obtenidos por las muestras analizadas (x_1, x_2, x_3, \dots), se consigue los valores de concentración (y_1, y_2, y_3, \dots).

La concentración real de gliadinas en una muestra se calcula mediante la fórmula:

$$ppm = C \times D \times 40 / 1.000$$

Donde:

C: es la concentración de gliadina [ng/mL] (obtenida en la curva).

D: es la dilución de la muestra (1:50).

40: es el factor de dilución resultante de la extracción, ya que se pesan 0,25 g y se obtiene un volumen final de 10 mL ($10 \text{ mL} / 0,25 \text{ g} = 40 \text{ mL/g}$).

1.000: factor de conversión para pasar de ng/mL a ppm.

y la expresión de las unidades se obtiene así:

$$\begin{aligned} ppm &= (\text{ng/mL}) \times D \times (\text{mL/g}) / (\text{ng}/\mu\text{g}) \\ &= \mu\text{g/g} = \text{mg/kg} \end{aligned}$$

BIBLIOGRAFÍA

ALINORM 08/31/26 Apéndice III (2008). Proyecto de norma revisada del Codex relativa a los alimentos para regímenes especiales destinados a personas intolerantes al gluten (Codex Stan 118-1981). CCFNSDU, Ginebra.

Mendez E, Vela C, Immer U, Janssen FW (2005). Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. Eur J Gastroenterol Hepatol 17:1053-1063.

Reglamento CE N.º 41/2009 de la Comisión de 20 de enero de 2009 sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Para convertir el valor de ppm o mg de gliadina/kg de muestra detectadas en ppm o mg de gluten/kg de muestra, se aplica el factor de conversión 2, basándose en la aceptación de que las gliadinas representan el 50% de las proteínas presentes en el gluten. Los resultados por debajo del límite de cuantificación se expresan así: < 3,1 mg gluten/kg muestra.

Se deben rellenar toda la información que se recoge en las siguientes tablas P5-4 y P5-5.

Tabla P5-4. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS POR LA TÉCNICA ELISA

Número de muestra	Tipo de matriz (cárnico, cereal...)	Presencia o no de prolaminas	Concentración de gluten detectada (mg/kg)	Denominación del producto: - exento de gluten - contenido muy reducido en gluten

Tabla P5-5. ALIMENTOS CON RIESGO DE CONTENER GLUTEN

	Grupo carnes	Grupo pescados	Grupo lácteos
Cita un alimento con mayor riesgo de contaminación con gluten de las siguientes matrices			
Cita seis denominaciones de ingredientes en el etiquetado donde puede aparecer "gluten oculto"			



COMENTARIOS

Adipocitos y adipoquinas: cultivo primario de adipocitos de rata

P. Pérez-Matute, S. Lorente-Cebrián y M. J. Moreno-Aliaga

INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo, además de ser el principal reservorio energético del organismo, interviene en otros procesos, como son la termorregulación, la protección mecánica y el aislamiento térmico. Desempeña además importantes funciones endocrinas y es fuente de células madre adultas. Desde el punto de vista histológico, el tejido adiposo es uno de los considerados tejidos conectivos o conjuntivos laxo y puede presentarse en dos formas: tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo o marrón. Ambos están bajo la influencia del sistema nervioso simpático, participando de manera conjunta en el metabolismo energético. No obstante, existen importantes diferencias morfológicas, anatómicas y funcionales entre ellos.

El tejido adiposo blanco constituye el sistema de reserva energética más importante de los organismos superiores, ya que en sus células se almacena el exceso de energía en forma de triglicéridos, permitiendo su rápida movilización para ser utilizada en cualquier momento. Esta característica supone un factor determinante para la supervivencia de las especies, ya que asegura una continua disponibilidad de energía, independientemente de los recursos disponibles en el medio.

Una vez que el tejido adiposo está completamente formado, los adipocitos, células de gran tamaño (120 micras), representan entre uno y dos tercios del mismo. El núcleo de los adipocitos es periférico y el citoplasma se halla ocupado casi en su totalidad (70-80%) por una gran gota lipídica (adipocitos uniloculares). Las restantes células del tejido adiposo son precursores de los adipocitos con distintos grados de diferenciación, células sanguíneas, endoteliales y macrófagos.

La idea tradicional que se tenía del tejido adiposo como reservorio pasivo para el almacenamiento de energía ha dejado de ser válida desde hace unos años. En la actualidad, se conoce que el tejido adiposo es capaz de expresar y secretar una gran variedad de péptidos bioactivos denominados adipoquinas que pueden actuar tanto a nivel local (autocrino/paracrino) como sistémico (endocrino). Un número importante de estas adipoquinas son secretadas por la fracción adipocitaria del tejido adiposo. Además de estas señales, el tejido adiposo también expresa importantes y numerosos receptores. Por todo ello, podría decirse que el tejido adiposo además de ser un órgano necesario para el almacenamiento y liberación de energía, también contiene la maquinaria necesaria para permitir la comunicación con distintos órganos, incluido el sistema nervioso central (SNC).

Además, la importante función endocrina que desarrolla el tejido adiposo se pone de manifiesto por las consecuencias fisiopatológicas que se derivan tanto de un exceso como de una deficiencia de dicho tejido. Así pues, el estudio en profundidad de la función endocrina y metabólica del tejido adiposo blanco permitirá un mejor conocimiento de las consecuencias adversas que se generan debido a ese exceso (obesidad) o deficiencia (lipoatrofia), permitiendo, por tanto, una búsqueda más fructífera del tratamiento de las enfermedades asociadas.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es el aislamiento y cultivo en una matriz de colágeno de adipocitos primarios procedentes de la grasa epididimal de

ratas macho con el fin de poder estudiar el metabolismo de estas células en una disposición lo más parecida a la fisiológica.

PROCEDIMIENTO

Material y reactivos

Animales de experimentación

Se emplearán ratas macho de 250-280 gramos de peso aproximadamente y mantenidas en condiciones de temperatura (22 ± 2 °C) y humedad constantes con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y alimentadas con una dieta estándar y agua *ad libitum*.

Las ratas que se utilicen en esta práctica han de manipularse de acuerdo con las Guías Nacionales e Institucionales de Cuidado y Uso de Animales y con la aprobación del Comité de Ética para la Experimentación Animal de la institución donde se lleve a cabo el procedimiento.

Equipos

- Campana de seguridad biológica.
- Baño con agitación.
- Incubador para cultivo celular.
- Centrífuga.
- Autoclave.
- Balanza.

Reactivos para soluciones

- *Buffer Hepes-Fosfato*:
 - Albúmina sérica bovina fracción V.
 - NaCl.
 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
 - KH_2PO_4 .
 - Na_2HPO_4 .
 - Hepes 1M.
 - D-Glucosa.
- *Medio de cultivo (Dubbelco's Modified Eagle Medium – DMEM)*:
 - Suero fetal bovino.
 - Penicilina/Estreptomicina.
 - Nistatina.
 - Aminoácidos no esenciales.

- *Otros reactivos y materiales necesarios*:

- Colagenasa.
- Colágeno.
- *Minimum Essential Medium (MEM)*.
 - Placas de cultivo de 6 pocillos.
 - Placas de Petri.
 - Material de disección esterilizado.
 - Cánulas de metal y gomas para revestirlas.
 - Jeringas de 10 mL.
 - Membranas de nailon de 400 μm .

Fundamento

El objeto de esta práctica es el aislamiento de adipocitos procedentes de la grasa epididimal de ratas macho mediante una digestión con colagenasa. Los adipocitos aislados se cultivan posteriormente en una matriz de colágeno con medio DMEM hasta un período máximo de 96 horas (límite de tiempo en el cual los adipocitos mantienen sus características y fenotipo diferenciado). Los adipocitos así anclados en la capa de colágeno presentan una disposición más similar a la fisiológica que cuando se cultivan en suspensión, y permiten el estudio *in vitro* de los efectos de diferentes fármacos, antioxidantes, macronutrientes, etc., sobre el adipocito maduro. Por ello, tras el tratamiento de los adipocitos con las sustancias de interés, se puede recoger el medio de cultivo y congelarlo a -80 °C para una posterior cuantificación de diferentes adipocinas (leptina, adiponectina, visfatina...) o metabolitos (glucosa, lactato, glicerol) producidos o captados por los adipocitos y que pueden verse modificados por los tratamientos llevados a cabo. Asimismo, los adipocitos pueden ser guardados a -80 °C para un posterior análisis de la expresión génica (Fig. P6-1).

Protocolo

Preparación de soluciones

Buffer Hepes-Fosfato

Para el cultivo de adipocitos procedentes de 4-6 ratas se suelen preparar 500 mL de buffer hepes-fosfato de la siguiente composición:

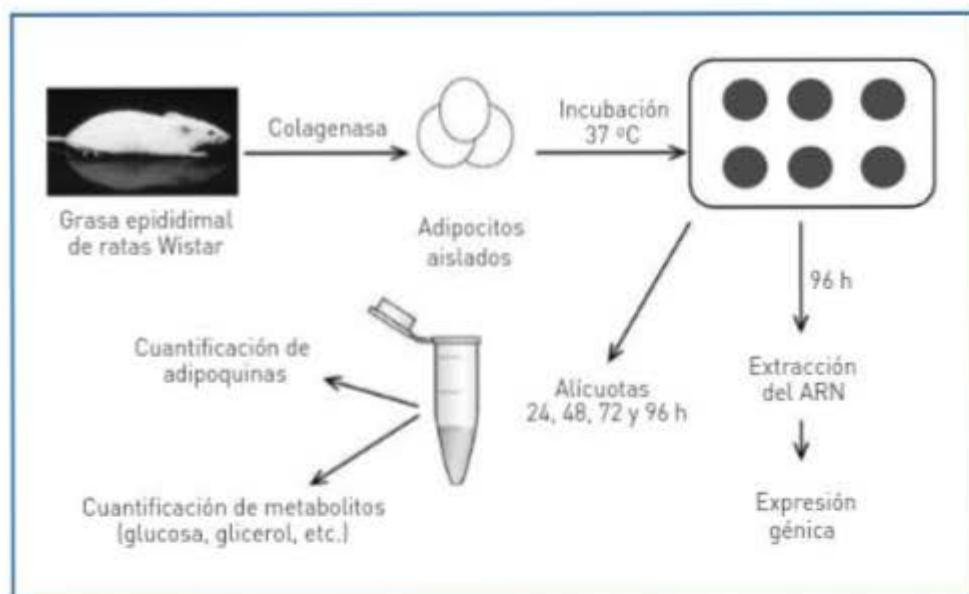


Figura P6-1. Esquema de la obtención, aislamiento y cultivo de adipocitos procedentes de la grasa epididimal de ratas macho así como posteriores análisis que pueden llevarse a cabo.

- 135 mM NaCl
- 2,2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 1,25 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,45 mM KH_2PO_4
- 2,17 mM Na_2HPO_4
- 10 mM HEPES 1M
- 5 mM D-Glucosa
- 2% BSA

Tras la mezcla se debe ajustar el pH a 7,2-7,4, filtrarlo a través de papel de filtro y finalmente esterilizarlo a través de un filtro de 0,2 μm de diámetro de poro.

Medio de cultivo

El medio de cultivo es DMEM bajo en glucosa (1 g/L) suplementado con suero fetal bovino (1%), aminoácidos no esenciales (1%), nistatina (1%) y penicilina/estreptomicina (1%).

A este medio se le pueden añadir diferentes tratamientos (nutrientes, hormonas o fármacos) objeto de estudio, manteniendo siempre un medio control con la misma proporción del vehículo en el que haya sido disuelta la sustancia de interés/estudio.

Aislamiento de los adipocitos

Tras sacrificar las ratas, se extirpa el tejido graso epididimal. El procesamiento de la grasa se debe realizar a partir de ese momento en condi-

ciones de esterilidad, bajo campana de seguridad biológica de flujo laminar previamente esterilizada por exposición a luz ultravioleta. El material de disección ha de estar también estéril (autoclavado).

El tejido adiposo extraído se deposita en una placa Petri con buffer hepes-fosfato atemperado (37 °C). Tras pesar el tejido, se debe trocear con tijeras durante unos 90 segundos. A continuación, se procede a la digestión del tejido fragmentado mediante incubación con colagenasa (1,25 mg/mL por 0,5 g de tejido) a 37 °C durante 30-40 minutos y con agitación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añade buffer hepes-fosfato (24 mL) con el fin de parar la reacción enzimática. Se filtra entonces la grasa digerida a través de membranas de nailon de 400 μm de tamaño de poro para retener el tejido no digerido y obtener únicamente los adipocitos aislados. A continuación, y con el objeto de eliminar los restos de colagenasa así como los preadipocitos, se realizan dos lavados con buffer hepes-fosfato mediante centrifugación a 200 \times g durante 6 minutos en tubos Falcon de 50 mL. Se retira el infranadante (contiene los preadipocitos) utilizando cánulas de metal revestidas de goma (ya que el metal puede favorecer la lisis de los adipocitos) y acopladas a jeringas. El último lavado se realiza con DMEM y tras centrifugar en las mismas condiciones, se retira de nuevo el infranadante y se añade DMEM hasta 14-15 mL. Se incuban entonces las suspensiones de los adipocitos aislados a 37 °C y 5% CO_2 durante 30 minutos.

Cultivo de los adipocitos

Una vez transcurridos los 30 minutos, se retira el infranadante hasta alcanzar una relación volumétrica de 2:1 de células/medio (las células se quedan siempre flotando en la parte superior) y se mezclan cuidadosamente las células y el medio para conseguir una suspensión celular homogénea.

Los adipocitos se cultivan preferiblemente en placas de 6 pocillos en una matriz de colágeno. Para ello, se añaden 150 μL de cada suspensión celular a cada pocillo en los que previamente se deben depositar 500 μL de la solución de colágeno. Se mezclan girando y agitando cuidadosamente hasta conseguir una distribución homogénea de las células en la capa de colágeno. Se introducen las placas en el incubador ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 5% CO_2) durante 40 minutos hasta que se logra la solidificación de la capa de colágeno en la que quedan atrapados los adipocitos. A continuación, se añade a cada pocillo 2 mL de los medios correspondientes (mantenidos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en atmósfera de 5% CO_2).

Una vez añadidos los medios, se introducen las placas en el incubador durante el período de tiempo deseado (0-96 horas). Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento adecuado se toman alícuotas del medio y se congelan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización para la determinación de diferentes adipoquinas secretadas por los adipocitos, así como para la cuantificación de los niveles de glucosa, lactato y glicerol presentes en el medio.

Además, transcurrido el período de tratamiento y recogidas las alícuotas deseadas, se elimina el resto del medio de las placas de cultivo y éstas se almacenan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior extracción de ARN y análisis de la expresión de genes.

BIBLIOGRAFÍA

- Lorente-Cebrián S, Bustos M, Martí A, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ (2009). Eicosapentaenoic acid stimulates AMP-activated protein kinase and increases visfatin secretion in cultured murine adipocytes. *Clin Sci (Lond)* 117:243-9.
- Moreno-Aliaga MJ, Swarbrick MM, Lorente-Cebrián S, Stanhope KL, Havel PJ and Martínez JA (2007). Sp1-mediated transcription is involved in the induction of leptin by insulin-stimulated glucose metabolism. *J Mol Endocrinol* 38:537-46.
- Pérez-Matute P, Martí A, Martínez JA, Fernández-Otero MP, Stanhope KL, Havel PJ and Moreno-Aliaga MJ (2005). Eicosapentaenoic fatty acid increases leptin secretion from primary cultured rat adipocytes: role of glucose metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R1682-8.
- Pérez-Matute P, Martí A, Martínez JA, Fernández-Otero MP, Stanhope KL, Havel PJ and Moreno-Aliaga MJ (2007). Conjugated linoleic acid inhibits glucose metabolism, leptin and adiponectin secretion in primary cultured rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 268:50-8.
- Rodbell M (1964). Localization of lipoprotein lipase in fat cells of rat adipose tissue. *J Biol Chem* 239:753-5.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



El registro del peso de los animales así como de la grasa epididimal extraída y utilizada debe recogerse de la siguiente forma:

MODELO 1. REGISTRO DE DATOS DEL ANIMAL DEL QUE SE PROCEDE AL AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LOS ADIPOCITOS EPIDIDIMALES

	Peso de la rata (g)	Peso de la grasa epididimal (g)
Rata 1		
Rata 2		
Rata 3		

Ya que el objeto del cultivo de los adipocitos en la matriz de colágeno es el estudio de los efectos *in vitro* de diferentes tratamientos (fármacos, hormonas, nutrientes, etc.), sobre la función endocrina y metabólica del adipocito, resulta de gran utilidad la realización de una tabla similar a la que se indica a continuación con el fin de registrar las posibles incidencias observadas en las placas así como los valores de los parámetros a analizar.

MODELO 2. EJEMPLO DE UN REGISTRO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS ENSAYADOS EN LAS PLACAS, LAS INCIDENCIAS OBSERVADAS ASÍ COMO LOS VALORES DE LOS DIFERENTES PARÁMETROS QUE SE DESEEN ANALIZAR

				Determinaciones		
Placa 1	Pocillo	Tratamiento	Observaciones	Glucosa	Glicerol	Leptina
	1	Control				
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
Placa 2						
	1	Control				
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					

COMENTARIOS



Determinación de la actividad lipolítica *in vitro*

A. Lasa Elgezua y M. P. Portillo Baquedano

INTRODUCCIÓN

La lipólisis hace referencia al proceso metabólico por el cual los lípidos acumulados en diferentes depósitos grasos del organismo son hidrolizados hasta ácidos grasos y glicerol, con objeto de obtener sustratos para otras reacciones metabólicas.

La completa hidrólisis de los triglicéridos da como resultado tres moléculas de ácidos grasos y una de glicerol, y está mediada por: la triglicérido lipasa o desnaturina (ATGL, *adipose triglyceride lipase*), que hidroliza fundamentalmente triglicéridos; la lipasa sensible a hormonas (HSL), que tiene baja actividad como triglicérido lipasa y degrada fundamentalmente diglicéridos, y c) la monoglicérido lipasa. Con la excepción de la actividad de la monoglicérido lipasa, este proceso se encuentra bajo la precisa regulación de hormonas como las catecolaminas (estimulación adrenérgica).

Los efectos de la estimulación adrenérgica se producen tras la unión de las catecolaminas a los receptores β -adrenérgicos (β_1 y β_2 en humanos y β_1 , β_2 y β_3 en ratón). Esta unión permite su interacción con una proteína Gs, lo que produce un incremento de la actividad adenilato ciclasa. De este modo, se incrementa el nivel de AMP cíclico y se activa la proteína quinasa A (Fig. P7-1). Pero además, las catecolaminas cuando se unen a receptores α_2 -adrenérgicos, son capaces de inhibir la lipólisis. Tras esta unión se produce la interacción con la proteína Gi, que inhibe la adenilato ciclasa, reduciendo así la concentración de AMPc. Las catecolaminas tienen por tanto un efecto dual sobre la lipólisis, y su efecto lipolítico depende del balance entre receptores adrenérgicos β y α (Fig. P7-1).

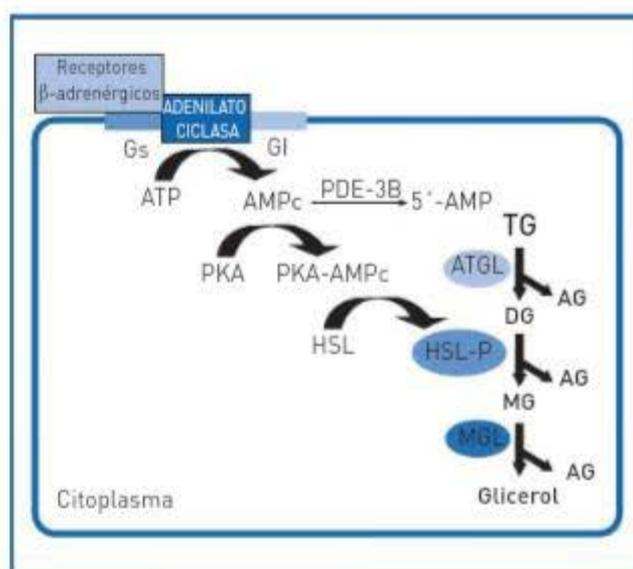


Figura P7-1. Regulación del proceso lipolítico por la estimulación β -adrenérgica en el adipocito.

El proceso lipolítico puede ser estudiado en condiciones basales o estimuladas por medio de sustancias lipolíticas de naturaleza diversa. Estas sustancias pueden actuar en diferentes puntos de la cascada lipolítica. Así, los compuestos lipolíticos frecuentemente utilizados son: isoproterenol (ISO), un agonista β -adrenérgico; forskolina (FK), un activador de la adenilato ciclasa; dibutilil-AMP cíclico (DB-AMPc), un análogo del AMP cíclico, y 3-isobutil-metil-xantina (IBMX), un inhibidor de la enzima fosfodiesterasa.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es analizar la actividad lipolítica basal y estimulada por distintas sustancias lipolíticas en adipocitos aislados de tejido

adiposo de rata. Asimismo, se determina la dosis eficaz 50 (EC 50) para un determinado agente lipolítico, que es aquella que consigue el 50% del efecto máximo, por medio de los resultados obtenidos en la curva dosis-respuesta (Fig. P7-4).

PROCEDIMIENTO

Fundamento

El fundamento de esta práctica es medir por espectrofotometría la liberación de glicerol como índice de lipólisis en adipocitos aislados a partir de tejido adiposo de rata. Dicha valoración se realiza en condiciones basales y tras la estimulación de la cascada lipolítica.

La cuantificación de glicerol liberado se lleva a cabo por la técnica espectrofotométrica de Wieland, basada en las siguientes reacciones (Fig. P7-2):

Material y equipos

Muestras biológicas

- Tejido adiposo de rata.

Equipos

- Balanza analítica.
- Baño con agitación.
- Vortex.
- Espectrofotómetro y cubetas.

Material

- Tijeras.
- Pinzas.
- Placas de Petri.

- Jeringas de 50 mL en las que se ha eliminado la parte opuesta al émbolo.
- Jeringa de 10 mL con aguja larga.
- Vasos de plástico de 50 mL.
- Tubos de vidrio de 50 mL.
- Tubos de ensayo de plástico de 5 y 10 mL.
- Filtros de nailon.
- Gomas.
- Micropipetas de 5-40 μ L, 40-200 μ L y 100-1.000 μ L.
- Puntas de micropipeta de 1.000 μ L con la punta cortada.
- Pipetas de vidrio de 10 mL.
- Tubos Eppendorf.

Reactivos

- Colagenasa A, procedente de *Clostridium histolyticum*, con actividad de 0,355 U/mg de liofilizado.
 - Tampón Krebs-Ringer Bicarbonato Albúmina (KRBA): se debe preparar el mismo día de la determinación para evitar alteraciones, con los siguientes componentes y en las proporciones señaladas:
 - Cloruro sódico (NaCl) 0,154 M..... 100 mL
 - Cloruro potásico (KCl) 0,154 M.... 4 mL
 - Cloruro cálcico dihidratado (CaCl₂·2H₂O) 0,11 M 3 mL
 - Dihidrógeno fosfato potásico (KH₂PO₄) 0,155 M..... 1 mL
 - Sulfato magnésico heptahidrato (MgSO₄) 0,155 M 1 mL
 - Hidrógeno carbonato sódico (NaHCO₃) 0,155 M 21 mL
 - Albúmina bovina fracción V..... 3,5 g
 - Glucosa 108 mg
- El pH se ajusta a 7,4 con HCl 1N o NaOH 1N.



Figura P7-2. Reacción del glicerol para su cuantificación. La hidrazina bloquea el grupo ceto y hace la reacción irreversible.

- Diluciones seriadas de las sustancias lipolíticas: se preparan disoluciones madre de agentes lipolíticos que se quieran ensayar a la concentración de 10^{-2} M. Se hacen alícuotas de 100 μ L y se congelan hasta el día de su uso.
 - FK (10^{-2} M) 41,1 mg/10 mL dimetilsulfóxido.
 - IBMX (10^{-2} M) 22,2 mg/10 mL H₂O destilada.
 - DB-AMPc (10^{-2} M) 49,1 mg/10 mL H₂O destilada.
 - ISO (10^{-2} M) 24,8 mg/10 mL H₂O destilada.

El día del experimento se preparan, partiendo de las disoluciones madre, las diluciones seriadas de cada uno de estos compuestos desde una concentración 10^{-2} M hasta 10^{-8} M (Fig. P7-3).

En cada tubo de lipólisis se colocan 10 μ L de estas diluciones. Dado que el volumen final de cada tubo será de 1.000 μ L, las concentraciones finales de las sustancias lipolíticas serán 100 veces menores y, por tanto, se encontrarán en el rango de 10^{-4} M hasta 10^{-10} M.

Ejemplo:

Forskolina (10^{-5} M) \Rightarrow - 500 μ L de tampón KRBA.
 - 500 μ L de disolución de adipocitos.
 - 10 μ L de FK 10^{-5} M.

- Tampón hidrazina. Puede prepararse con anterioridad a su uso, guardándolo a 4 °C. Se prepara mezclando:
 - Glicocola 5 g
 - Hidrazina 52 mL
 - Cloruro magnésico (MgCl₂), 1 M.... 2 mL
 - Agua destilada c.s.p. 1 L

Se ajusta a pH 9,8 con HCl 1 N o NaOH 1 N.

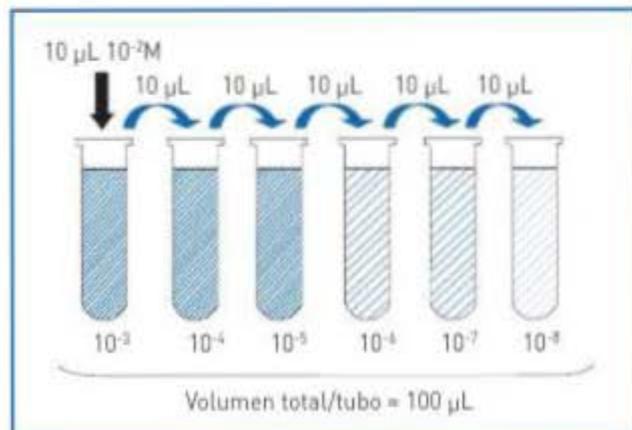


Figura P7-3. Modo de preparación de diluciones seriadas de cada agente lipolítico.

- Mezcla reactiva. Se prepara en el momento de usar. La composición de la mezcla, por cada uno de los tubos de ensayo, es la siguiente:

- Tampón hidrazina	1 mL
- Adenosín trifosfato (ATP)	0,75 mg
- Nicotín adenín dinucleótido (NAD)	0,375 mg
- Gliceraldehído deshidrogenasa (GDH) ..	2,5 mL
- Glicerofosfoquinasa (GK)	0,5 mL

El volumen final de mezcla reactiva, así como las cantidades de cada uno de los componentes, se calculan multiplicando las cifras anteriormente señaladas por el número de tubos.

- Disolución madre de glicerol. Se prepara una disolución madre de glicerol de concentración 1 M. Se emplea para preparar los patrones necesarios y construir así la curva patrón de la reacción espectrofotométrica, en la que se halla por interpolación la cantidad de glicerol liberado.
- Reactivo de Dole. Para preparar este reactivo se deben mezclar:
 - n-propanol..... 160 mL
 - Heptano 40 mL
 - H₂SO₄..... 4 mL
- Heptano.

Protocolo

Esta técnica se compone de varias etapas, las cuales se describen a continuación:

Obtención de adipocitos aislados

Tras el sacrificio de las ratas, se toma una muestra de unos 5 gramos de tejido adiposo de la localización anatómica que se desee. Se trocea el tejido adiposo en una placa de Petri y se introducen los fragmentos en el vaso de 50 mL con 30 mL de KRBA que contiene 1 mg/mL de colagenasa. Se colocan en un baño a 37 °C y agitación fuerte durante 90 minutos. Se filtran los adipocitos utilizando la jeringa cortada y el filtro de nailon y se realizan 3 lavados con 15 mL de KRBA cada vez para eliminar los restos de colagenasa.

Finalmente, se hace una dilución de los adipocitos 1:10 con KRBA.

Lipolisis

Se incuban los adipocitos en un medio biológico adecuado en presencia y ausencia de los agentes lipolíticos a ensayar (ISO, FK, DB-AMPc e IBMX) a distintas concentraciones y en agitación de acuerdo con el método de Rodbell. En este tiempo, se produce la liberación de los ácidos grasos y el glicerol.

En cada tubo se pipetea los siguientes reactivos:

- 10 μ L de cada agente lipolítico a la concentración correspondiente (excepto en los basales).
- 0,5 mL de tampón KRBA.
- 0,5 mL de disolución de adipocitos.

Se ponen los tubos a incubar en baño a 37 °C con agitación suave durante 90 minutos y transcurrido este tiempo se detiene la reacción poniendo los tubos en baño de hielo.

Cuantificación del glicerol

La cantidad de glicerol liberado al medio tras la incubación es una medida de la lipolisis producida.

Se preparan los patrones a partir de una dilución 1:1000 de la disolución madre de glicerol (disolución A).

	Concentración de glicerol (mM)	Cantidad de glicerol (μ moles)	Disolución A (μ L)	Agua destilada (μ L)
Blanco	0	0	-	200
Patrón I	0,25	0,05	50	150
Patrón II	0,5	0,1	100	100
Patrón III	0,75	0,15	150	50
Patrón IV	1	0,2	200	-

Se toman muestras de 200 μ L de cada uno de los tubos en que ha tenido lugar la lipolisis. Se añade 1 mL de la mezcla reactiva, tanto a los tubos problema como a los patrones. Se agita, y se espera 40 minutos a temperatura ambiente.

Se leen las absorbancias en el espectrofotómetro a 340 nm. Estas lecturas corresponden al NADH liberado en el transcurso de la reacción, que será directamente proporcional al NAD consumido y, por tanto, al glicerol presente en la muestra.

Determinación de los lípidos totales

La lipolisis producida durante la incubación depende de la cantidad de adipocitos presentes en el medio. Para tener en cuenta este factor se realiza la determinación de los lípidos totales por el método gravimétrico de Dole y Meinertz.

Se escogen al azar 5 tubos en los que se ha realizado la lipolisis, una vez retirados los 200 μ L, y se añade 1 mL del reactivo de Dole en cada uno de los tubos. Se agita durante 1 minuto y se deja reposar 15 minutos.

Se adiciona 1 mL de heptano en cada tubo. Se agita durante 1 minuto y se deja reposar 15 minutos. Se recogen 800 μ L de la fase de heptano, que es la que contiene los lípidos, y se introducen en los tubos Eppendorf previamente pesados.

Se espera a que se evapore el heptano, y se vuelve a pesar el recipiente con el residuo graso no evaporado, calculando el peso de éste por diferencia.

Cálculos

Los μ moles de glicerol/100 mg de lípidos correspondientes a cada tubo se obtienen mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu\text{mol glicerol}}{100 \text{ mg de lípidos}} = \frac{\mu\text{mol glicerol} \times 5}{\text{mg de lípidos} \times 1,5 \times 1,25} \times 100$$

Esta ecuación es la resultante de un conjunto de operaciones a realizar una vez conocida la cantidad de glicerol a partir del valor de absorbancia y el peso medio de grasa de los 5 tubos escogidos al azar para el DOLE.

Es importante considerar que la cantidad de glicerol debe multiplicarse por 5, ya que corresponde a una alícuota de 200 μ L procedente de 1.000 μ L, volumen total del tubo donde se ha llevado a cabo la reacción de lipolisis. Por otro lado, los mg de lípidos cuantificados por el DOLE corresponden a 800 μ L de la fase de heptano que se ha retirado para esta medición. La cantidad de grasa perteneciente a todo el volumen de la fase de heptano será 1,5 veces mayor ya que el volumen total es de 1.200 μ L de heptano (reactivo Dole + heptano). Además, la can-

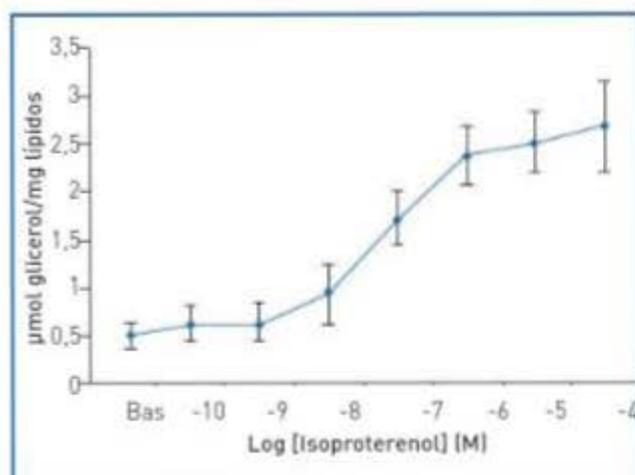


Figura P7-4. Curva dosis-respuesta del isoproterenol.

tividad de grasa correspondiente a todo el volumen de suspensión de adipocitos en KRBA será 1,25 veces mayor ya que el volumen total es de 1.000 μL y solamente se han utilizado 800 μL para esta medición.

Por último, se debe multiplicar el contenido de grasa total de cada tubo por 100 para poder expresar el resultado final como μmoles de glicerol liberados/100 mg de lípidos.

BIBLIOGRAFÍA

- Dole V & Meinertz H (1960). Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J Biol Chem* 235:2595-2599.
- Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS (2007). Regulation of lipolysis in adipocytes. *Ann Rev Nutr* 27:79-101.
- Rodbell M (1964). Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239:375-380.
- Wieland O (1957). Enzymic method for the determination of glycerine. *Biochem Z* 329:313-319.
- Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lip Res* 50:3-21.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Los resultados se expresan como μmoles de glicerol liberados por 100 mg de lípidos durante los 90 minutos de incubación.

Con los datos obtenidos para cada una de las concentraciones de cada agente lipolítico se construye una curva en la cual se representa la concentración de la sustancia frente a la actividad lipolítica (Fig. P7-4). Así, la dosis eficaz 50 (EC 50) del agente lipolítico será aquella concentración en la cual se obtenga el 50% de la respuesta lipolítica máxima de cada curva.

COMENTARIOS



A. Zabala Letona y M. P. Portillo Baquedano

INTRODUCCIÓN

La cantidad de triglicéridos acumulados en el tejido adiposo es el resultado del balance entre los procesos de acumulación, tales como la captación de ácidos grasos a partir de las lipoproteínas circulantes y la síntesis *de novo* de ácidos grasos a partir de precursores como la glucosa, y la movilización, proceso conocido como lipólisis.

En humanos, la lipogénesis *de novo* es una ruta metabólica de gran importancia en el hígado, pero no así en el tejido adiposo. No obstante, en los modelos de roedores (rata, hamster, ratón) muy utilizados en investigación y concretamente en estudios sobre obesidad, es una ruta relevante que contribuye en gran medida a la cantidad de triglicéridos acumulados en el tejido adiposo.

La primera reacción de la lipogénesis está catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACC) que por medio de una reacción irreversible da lugar a la formación de malonil-CoA mediante la carboxilación de acetil-CoA en presencia de ATP. La ACC por tanto cataliza la etapa limitante del proceso. El malonil-CoA formado es el sustrato empleado por el complejo multienzimático ácido graso sintasa (FAS) para generar ácidos grasos de cadena larga (principalmente palmitato) en una secuencia de siete reacciones y utilizando poder reductor en forma de NADPH. El NADPH requerido para la biosíntesis de lípidos tiene dos posibles procedencias: el ciclo de las pentosas fosfato, cuya enzima limitante es la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la reacción catalizada por la enzima málica (EM). Por ello, se considera a estas cuatro enzimas las enzimas lipogénicas del organismo (Fig. P8-1).

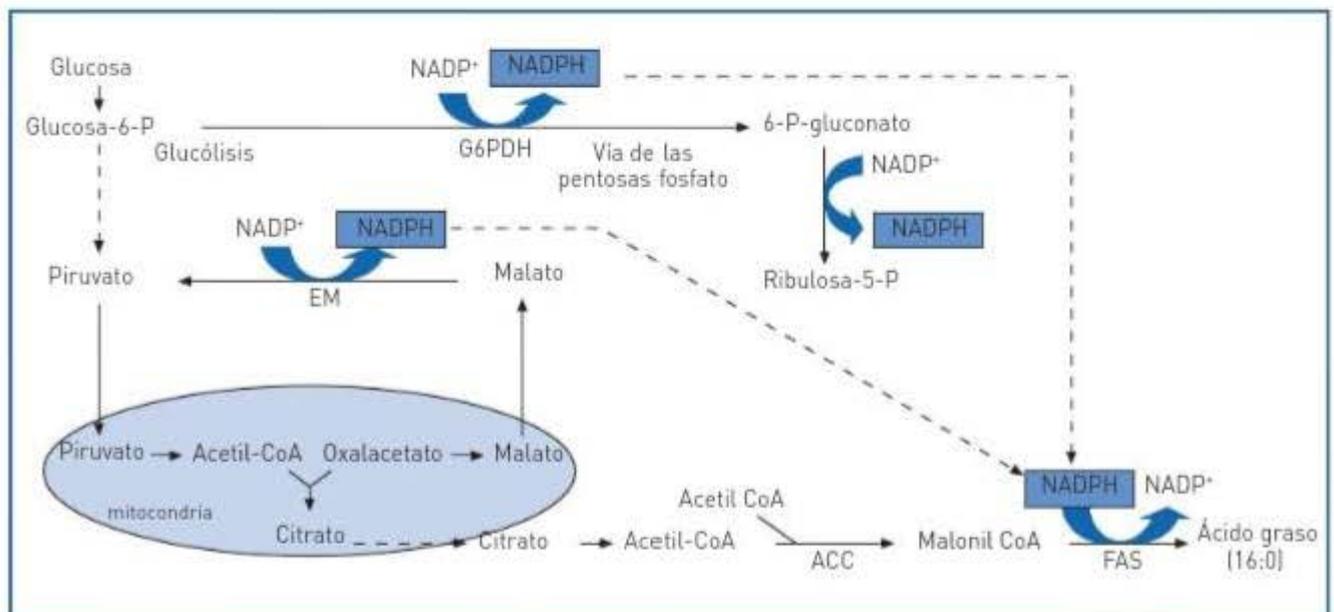


Figura P8-1. Lipogénesis *de novo* (modificado de Towle and Kaytor, 1997).

OBJETIVO

El objetivo de la práctica es la determinación de la capacidad lipogénica en tejido adiposo de rata mediante la cuantificación de la actividad de las dos enzimas principales participantes en esta vía, acetil-CoA carboxilasa (ACC) y ácido graso sintasa (FAS).

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Dado que los enzimas lipogénicos se encuentran en el citoplasma celular, en primer lugar se procede a homogeneizar el tejido adiposo en un tampón de resuspensión, y a continuación, mediante centrifugaciones seriadas, se separa el citoplasma de los adipocitos.

El procedimiento para valorar la actividad de la acetil-CoA carboxilasa es utilizar bicarbonato marcado con ^{14}C (que es el sustrato de la reacción) y medir la cantidad del mismo incorporado en el malonil-CoA, lo que permitió realizar un cálculo de la actividad enzimática mediante la cuantificación radiactiva de ^{14}C (Fig. P8-2).

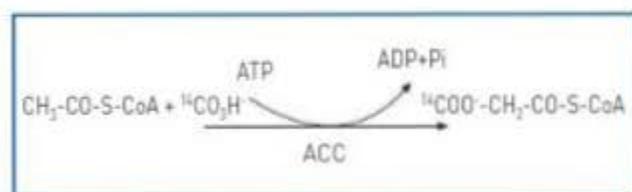


Figura P8-2. Reacción catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACC).

Para medir la actividad del complejo multienzimático ácido graso sintasa (FAS) se mide por absorbancia ($\lambda = 340 \text{ nm}$) el NADPH consumido a partir de la siguiente reacción (Fig. P8-3).

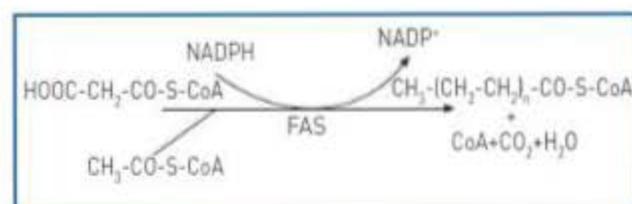


Figura P8-3. Reacción catalizada por la ácido graso sintasa (FAS).

Material y equipos

Muestras biológicas

- Tejido adiposo de rata.

Equipos

- Homogeneizador.
- Ultracentrífuga.
- Balanza.
- Agitador.
- Baño con control de temperatura y agitación.
- Espectrofotómetro.
- Contador β de radiactividad.

Material

Preparación del homogenado de tejido adiposo

- Tubos de vidrio y de ultracentrífuga.

Cuantificación de proteínas

- Matraz aforado.
- Placas de 96 pocillos.

Valoración de la actividad de la acetil-CoA carboxilasa

- Tubos Pyrex.
- Cronómetro.

Valoración de la actividad de la ácido graso sintasa

- Tubos Pyrex.
- Cronómetro.

Reactivos

Preparado del homogenado de tejido adiposo

- KCl.
- MgCl_2 .
- Ditiotretol.
- N-acetilcisteína.
- Tampón de resuspensión:
 - KCl 2,80 g
 - MgCl_2 0,0508 g

- Ditioneitol 0,0193 g
- N-acetilcisteína 0,4080 g

Se ajusta a 250 mL de H₂O destilada y pH = 7,6.

Cuantificación de proteínas

- Azul brillante de Coomassie G-250.
- Etanol.
- Ácido fosfórico.
- Seroalbumina bovina (BSA).
- Reactivo de Bradford (colorante):
 - Azul brillante de Coomassie G-250... 100 mg
 - Etanol 95% 50 mL
 - Ácido fosfórico 85% p/v..... 100 mL
 - Agua destilada ajustar a 1 L volumen final
- Solución stock de BSA: 10 mg de BSA en 10 mL de agua destilada (1 mg/mL).

Valoración de la actividad de la acetil-CoA carboxilasa

- Trizma HCl.
- Trizma base.
- NaHCO₃.
- Titriplex III (EDTA).
- MgCl₂·6H₂O.
- MnCl₂·4H₂O.
- Citrato tripotásico.H₂O.
- HCl.
- Seroalbumina bovina (BSA).
- L-Glutation.
- ATP.
- Acetil-CoA.
- Etanol absoluto.
- Líquido de centelleo.
- ¹⁴CO₃HNa (1 mCi/mol).
- Tampón tris pH 7,5 a 25 °C (pH 7,2 a 37 °C):
 - Trizma HCl 6,35 g
 - Trizma base..... 1,18 g
 - Agua ajustar hasta 1 L
- Se ajusta el pH a 7,5 a 25 °C.
- HCl 3 N: 26,5 mL de HCl al 35%/100 mL (25,07 mL si es HCl 37%).
- EDTA 2 mM: 75 mg/100 mL.
- Disolución tibia radiactiva ¹⁴CO₃HNa (actividad específica = 0,4 mCi/mmol):
 - 572 mg de NaHCO₃ + 10 mL de tampón tris (pH 7,5). De esta disolución se toman 1,83 mL

(1,25 mmol) y se le añade 250 µL de la fuente radiactiva de ¹⁴CO₃HNa (0,5 mCi).

- Disolución radiactiva (cantidades para 10 muestras):
 - BSA 1,67 mg
 - MgCl₂·6H₂O 4,50 mg
 - Glutation..... 2,54 mg
 - Citrato potásico.H₂O 4,71 mg
 - EDTA 2 mM 0,14 mg
 - ATP..... 11,08 mg
 - Acetil-CoA 1,38 mg
 - Disolución tibia de ¹⁴CO₃HNa..... 0,14 mL
 - Tampón Tris a pH 7,5 2,50 mL
- Disolución de incubación del sobrenadante (homogenado):
 - BSA 120 mg
 - MnCl₂·6H₂O 80 mg
 - Glutation..... 184 mg
 - Citrato potásico.H₂O 334 mg
 - EDTA 2 mM..... 5 mL
 - Tampón Tris a pH 7,5 ajustar a 100 mL

Valoración de la actividad de la ácido graso sintasa

- KH₂PO₄.
- EDTA.
- Cisteína.
- Acetil-CoA.
- Seroalbumina bovina (BSA).
- Malonil-CoA.
- NADPH.
- Disoluciones:
 - KH₂PO₄..... 1 M pH = 6,5
 - EDTA 50 mM
 - Cisteína 100 mM
 - Acetil-CoA 1,2 mM
 - Seroalbúmina bovina (BSA) 6 mg/mL
 - Malonil-CoA..... 7 mM
 - NADPH 2,4 mM
- Tampón de incubación a partir de las disoluciones anteriores (volúmenes/tubo):
 - KH₂PO₄ 200 µL
 - EDTA 100 µL
 - Cisteína..... 200 µL
 - BSA..... 100 µL
 - Acetil-CoA..... 100 µL

Protocolo

Preparación del homogenado de tejido adiposo

Se pesan 1,5 g de tejido adiposo y se añaden 3 mL de tampón de resuspensión. Se mezcla bien y se centrifuga a 5.000 g, 5 min. Se retira la capa de grasa (blanca) que queda en la fase superior y se trasvasa el resto a tubos de ultracentrifuga y centrifugar a 100.000 g, 40 min a 4 °C. A continuación se recoge el sobrenadante y se cuantifica la concentración de proteína por el método de Bradford por espectrofotometría. Finalmente, se hacen alícuotas de los homogenados de modo que tengamos:

- para determinación de actividad ACC: > 100 µg proteína en volumen de 100 µL
- para determinación de actividad FAS: > 750 µg proteína en volumen de 500 µL

Cuantificación de proteínas (método de Bradford)

Se colocan 10 µL de cada patrón de la solución stock de BSA en cada pocillo de una placa de 96 pocillos con las concentraciones siguientes (realizar duplicados por cada patrón):

Concentración (mg/mL)	BSA solución stock (µL)	Agua destilada (µL)
0	0	10
0,25	2,5	7,5
0,50	5	5
0,75	7,5	2,5
1	10	0

Se añaden a cada pocillo 10 µL de muestra (realizar duplicados para cada muestra). En principio sin diluir, pero en ocasiones requieren dilución, se debe ir probando hasta ajustar la absorbancia dentro de la recta patrón.

Se agregan 200 µL del reactivo Bradford a cada pocillo. Se incuba a temperatura ambiente unos 20 minutos (no más de una hora) y se mide la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (espectrofotómetro).

Valoración de la actividad de la acetil-CoA carboxilasa

Se preparan los siguientes tubos en un baño de hielo (volumen en µL):

	Disolución de incubación (µl)	Tampón tris (µl)	Sobrenadante (homogenado) (µl)
Muestra	250	150	100
Blanco	250	250	

Los tubos preparados se preincuban a 37 °C en un baño con agitación durante 30 minutos para activar la enzima. Se añaden a todos los tubos 250 µL de la disolución radiactiva (se inicia la reacción) y se incuban durante 2 minutos. A continuación se vuelven a añadir 200 µL de HCl 3 N para detener la reacción (el HCl convierte el CO_3H^- en CO_2 gas que se libera). Se añaden 3 mL de alcohol etílico y se evapora con burbujeo de nitrógeno en un baño a 37 °C.

Se disuelve el residuo seco en 0,5 mL de agua destilada con la ayuda de un agitator. Se toman 0,4 mL de esta disolución y se pipetea a un tubo de centelleo y finalmente se añaden 5 mL de líquido de centelleo y se agita vigorosamente.

Se cuantifica la radiactividad de los tubos en un contador β.

Valoración de la actividad de la ácido graso sintasa

En un baño de hielo se prepara una recta patrón a partir de la disolución madre de NADPH (2,4 mM), el blanco y los tubos de las muestras como se refleja en la siguiente tabla:

	Tampón de incubación (µl)	Patrón de NADPH (µl)	Agua destilada (µl)
Blanco	700	-	1.280
PI (60 nmol)	700	25	1.255
PII (120 nmol)	700	50	1.230
PIII (180 nmol)	700	75	1.205
PIV (240 nmol)	700	100	1.180
Muestra	700	125	1.155

Se preincuban los tubos en un baño a 37 °C durante 10-15 minutos. Se añaden 500 µL de muestra a los tubos muestra. Se sacan del baño al hielo y se leen en el espectrofotómetro ($\lambda = 340$ nm) (estos tubos son los blancos-muestra).

Se añaden a cada tubo 20 µL buffer malonil-CoA y en ese momento comienza la reacción. Se incuba 4 min en baño a 37 °C y se sacan los tubos a hielo (para detener la reacción). Se lee la absorbancia en el espectrofotómetro ($\lambda = 340$ nm).

Cálculos

Cuantificación de proteínas (método de Bradford)

Se traza la recta patrón (concentración de patrón BSA en mg/mL frente a absorbancia) y se obtiene la ecuación de la recta. A continuación, se interpolan los valores de absorbancia de las muestras en la recta patrón para obtener las concentraciones de proteínas correspondientes.

Valoración de la actividad de la Acetil-CoA carboxilasa

La actividad de la acetil-CoA carboxilasa se expresará en nmoles de HCO_3^- incorporados por minuto y por mg de proteína, para lo que se emplean las siguientes conversiones:

$$1 \text{ Ci} = 2,22 \times 10^{12} \text{ dpm}$$

La radiactividad específica de la disolución madre = 0,4 mCi/mmol

$$0,4 \text{ mCi/mmol} \times 2,22 \times 10^9 \text{ dpm/mCi} \times 10^{-6} \text{ mmol/nmol} = 888 \text{ dpm/nmol}$$

$$\text{Actividad} = \frac{(\text{dpm muestra} - \text{dpm blanco})}{888 \text{ dpm/nmol}} \times \frac{1}{P \times V} \times \frac{1}{t} \times \frac{5}{4}$$

dpm: desintegraciones por minuto

Ci: curio

P: concentración de proteínas (mg/mL) provenientes del homogenado del tejido adiposo

V: volumen del sobrenadante (mL) (0,01 mL)

t: tiempo de la reacción (2 min)

5/4: se cogen 0,4 mL de un total de 0,5 mL

Valoración de la actividad de la ácido graso sintasa

La actividad de FAS se expresa en nmoles de NADPH consumidos por minuto y por mg de proteína. Para ello, se realizan los siguientes cálculos:

Se traza la recta patrón (nmoles de NADPH frente a absorbancia) y se obtiene la ecuación de la recta.

A la absorbancia de cada muestra se le resta la de su correspondiente blanco-muestra para obtener la absorbancia real. Se interpola este valor en la recta patrón, obteniendo así los nmoles de NADPH consumidos para cada muestra y se divide entre la concentración de proteína, el volumen (0,5 mL) y el tiempo (4 min) para poder expresarlo por mg de proteína y min.

BIBLIOGRAFÍA

- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Chang HC, Seidman I, Teebor G, Lane DH (1967). Liver acetyl-CoA carboxylase and fatty synthase relative activities in the normal state and in hereditary obesity. *Biochim Biophys Res Comm* 28:682-686.
- Chacrabarty K, Leveille GA (1969). Acetyl-CoA carboxylase and fatty synthetase activities in liver and adipose tissue of meal-fed rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 13:1051-1054.
- Nepokroeff CM, Qureshi AA, Porter JW (1975). Cell-free synthesis of pigeon liver fatty acid synthetase. *Biochem Biophys Res Commun* 67:345-352.
- Towle, HC, Kaytor EN (1997). Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu Rev Nutr* 17:405-433.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Cuantificación de proteínas (método de Bradford)

	Absorbancia ($\lambda = 595 \text{ nm}$)	Concentración proteína (mg/mL)
Muestra 1		
Muestra 2		
Muestra n		

Tener en cuenta los cálculos en caso de haber realizado dilución de la muestra.

Valoración de la actividad de la acetil-CoA carboxilasa

	P (mg/mL)	Actividad (nmol/mg/min)
Muestra 1		
Muestra 2		
Muestra <i>n</i>		

P: concentración de proteínas (mg/mL) provenientes del homogenado del tejido adiposo.

Valoración de la actividad de la ácido graso sintasa

	Abs muestra	Abs blanco-muestra	Abs real	nmoles NADP ((abs real-b)/a)	Prot (mg/mL)	Actividad (nmol/mg/min)
Muestra 1						
Muestra 2						
Muestra <i>n</i>						

Abs: absorbancia.

COMENTARIOS

Metabolismo hepático del colesterol

V. Navarro Santamaría y M. P. Portillo Baquedano

INTRODUCCIÓN

El colesterol es un lípido con múltiples e importantes funciones. Por un lado, es componente de las membranas biológicas de células eucariotas del reino animal. En los individuos adultos, más del 90% del colesterol del organismo se localiza en las membranas, mientras que sólo un 7% circula por plasma. La función del mismo en las membranas celulares es la de regular su fluidez y su permeabilidad y, en consecuencia, su función. Por otro lado, el colesterol es precursor de otras biomoléculas importantes como son los ácidos biliares, las hormonas esteroideas y la vitamina D.

Además, el colesterol es un importante protector cutáneo debido a que, junto con otras sustancias lipoides que, como él, también se depositan en grandes cantidades en la piel, impide la absorción de sustancias hidrosolubles a través de la misma, ya que es inerte frente a ácidos y solventes que, de otra manera, podrían penetrar fácilmente en el organismo. Además, estos lípidos también evitan la evaporación masiva de agua por la piel.

Por último, el colesterol es necesario para la síntesis y secreción de lipoproteínas, ya que es uno de los componentes de éstas. Debido a su carácter hidrofóbico, el transporte del colesterol y triglicéridos en sangre se realiza mediante las lipoproteínas, que contienen colesterol en diferentes proporciones. Los depósitos de colesterol libre y esterificado definen la actividad de enzimas clave en el metabolismo del colesterol, como son las que mediremos en esta práctica.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es evaluar algunas rutas metabólicas involucradas en el metabolismo hepático del colesterol, a través de la medida de la actividad de algunas enzimas clave en las mismas.

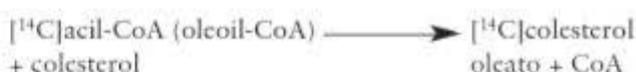
PROCEDIMIENTO

Fundamento

La actividad de las enzimas involucradas en las diferentes rutas metabólicas que controlan el metabolismo del colesterol se mide en unos orgánulos llamados microsomas.

La valoración de la actividad de la hidroximetilglucaryl coenzima A reductasa (HMGCoAR) se realiza por radiometría. Para ello se desfosforila la enzima con una fosfatasa con el fin de generar su forma activa. Después se añade el sustrato marcado con ^{14}C , que en presencia de NADPH se convierte en ácido mevalónico en medio ácido. Para separar el producto marcado del no transformado, se utiliza una columna de resina intercambiadora de iones.

La determinación de la acil-CoA: colesterol aciltransferasa (ACAT) se realiza mediante una técnica radiométrica que utiliza la oleoil-CoA marcada con ^{14}C en la posición 1. La enzima cataliza la siguiente reacción:



La actividad de la colesterol éster hidrolasa (CEH) se determina por cuantificación del ácido oleico marcado que se libera de la hidrólisis del sustrato $[^{14}\text{C}]\text{oleato de colesterol}$.

$[^{14}\text{C}]$ oleato de colesterol \longrightarrow colesterol + $[^{14}\text{C}]$ oleico

Esta última enzima tiene dos localizaciones: microsomal y citosólica. Para conocer la actividad de cada una de ellas, la determinación ha de realizarse en la fracción microsomal y en el sobrenadante de la extracción de ésta, tal y como se detalla más adelante en el protocolo de extracción de los microsomas.

Material y equipos

Muestras biológicas

- 1 g de hígado de hámster, rata o ratón.

Equipos

- Ultracentrífuga (microsomas).
- Balanza (microsomas, ACAT, HMGCoAR, CEH).
- Baño sonicador (CEH).
- Estufa (ACAT, CEH).

Material

- Vasos de precipitados (microsomas, ACAT, HMGCoAR, CEH).
- Homogenizador de vidrio (microsomas).
- Hielo picado (microsomas, ACAT, HMGCoAR, CEH).
- Microperforadores de 19 G y 25 G, pinzas y tijeras (microsomas).
- Tubos Eppendorf (microsomas).
- Pipetas Pasteur de vidrio (microsomas, ACAT, HMGCoAR, CEH).
- Soporte con pinzas (HMGCoAR).
- Placa de plástico de silicagel para TLC (ACAT, CEH).
- Tanque para placas de TLC (ACAT, CEH).
- Jeringa Hamilton (ACAT, CEH).
- Papel de filtro (ACAT, CEH).
- Viales de centelleo (ACAT, HMGCoAR, CEH).

Reactivos

Preparación de microsomas hepáticos

- Tampón de microsomas:
 - KH_2PO_4 50 mM (6,804 g/L).

- Sacarosa 100 mM (3,08 g/L).
- Ditioneitol (DTT) 0,5 mM (0,0771 g/L).
- EDTA 10 mM (3,684 g/L).
- NaCl 50 mM (2,922 g/L).

Se ajusta el volumen a 1.000 mL con agua destilada y el pH a 7,2 con NaOH.

Actividad de la hidroximetil glutaril CoA reductasa (HMGCoAR)

- Líquido de centelleo.
- Ditioneitol (DTT).
- Fosfatasa alcalina tipo III.
- KH_2PO_4 y K_2HPO_4
- Albúmina sérica bovina (BSA).
- KCl.
- 3 β -hidroxi-3 β -metilglutaril-Coenzima A, DL-3-[glutaryl-3- ^{14}C] (10 $\mu\text{Ci}/0,5$ mL).
- 3 β -hidroxi-3 β -metilglutaril-Coenzima A.
- [^3H]ácido mevalónico (0,25 mCi/0,5 mL).
- Etanol absoluto.
- HCl 10 N.
- Resina AGIX8 BioRad.
- Lana de vidrio.
- Tampón A: el mismo que el tampón de microsomas pero con DTT 10 mM.
- Fosfatasa alcalina:
 - Deben añadirse 0,5 U por tubo. Si el envase tiene 79,3 U/mg prot y 12,3 mg prot/mL, se debería añadir 5 μL en 195 μL de agua destilada. Así, se añaden 20 μL de esta disolución a cada tubo (10 tubos).
- Tampón Beg:
 - KH_2PO_4 : 204 mg/mL
 - K_2HPO_4 : 261,2 mg/mL
- Mezcla de tampones: se mezclan 2 mL de A con 8 mL de Beg y se añaden 50 mg de BSA y 149 mg de KCl.
- Control de la disolución comercial de HMG-CoA caliente (radiactiva): se toman 5 μL de la disolución comercial y se cuenta la radiactividad en 5 mL de líquido de centelleo. El valor debe rondar los 220.000 dpm. Si la disolución madre presenta una radiactividad de 10 $\mu\text{Ci}/0,5$ mL y una actividad específica de 57,0 mCi/mmol, cada nmol de producto se corresponde con un conteo de 126.540 dpm. (1 Ci = $2,22 \cdot 10^{12}$ dpm).
- Preparación de la disolución de HMG-CoA tibia (mezcla de reactivo radiactivo y no radiac-

tivo): se pesan 5 mg de HMG-CoA frío y se disuelven en 5 mL de tampón Beg. Se toman 2,833 mL de esta disolución y se añaden 0,5 mL de la disolución caliente (10 μCi), así tendremos 1 nmol de ^{14}C y 18,6 nmoles de HMG-CoA frío. El exceso se almacena en alícuotas a -20°C . Para la determinación se necesitan 20 μL que contiene 125.000 dpm.

- NADPH: se necesitan 0,7 mg de NADPH por tubo (30 μL). Para 10 muestras se pesan 0,0070 g en 300 μL de agua destilada.
- Disolución de ^3H mevalonolactona (MVN): se necesitan unos 10.000 dpm por tubo (20 μL). Si la disolución comercial contiene 0,25 mCi/0,5 mL (1 Ci = $2,22 \times 10^{12}$ dpm), para tener 10.000 dpm por tubo, tenemos que añadir 19,991 μL de etanol a 0,009 μL de la mevalonolactona pura (10 μL en 22,21 mL de etanol).
- Disolución de resina: se realiza una mezcla fluida con agua destilada.

La disolución de NADPH ha de hacerse el mismo día de la determinación. El resto se prepara el día anterior.

Actividad de la acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT)

- KH_2PO_4 100 mM pH 7,0.
- Albúmina bovina sérica (BSA) 60 μM .
- Acetato de etilo/hexano (1:9) (v/v).
- Yodo sólido.
- Cloroformo/metanol (2:1) (v/v).
- Oleato de colesterol frío (frío significa no marcado radiactivamente).
- KCl 0,1 M.
- Oleoil-CoA frío.
- Oleoil-CoA [$1-^{14}\text{C}$] para cada muestra 60 μM , 12 nmol en 25 μL , 0,1-0,4 μCi .
- [9, 10- ^3H] oleato de colesterol para cada muestra entre 15.000 y 30.000 dpm por cada 25 μL de cloroformo.
- Líquido de centelleo.
- Preparación del [$1-^{14}\text{C}$]Oleoil-CoA tibio: si el envase original es de 50 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$, se debe añadir 2,125 mL de Oleoil-CoA frío que contenga 700 μmoles en tampón fosfato o dH_2O . Se almacena a -80°C en alícuotas de 500 μL que son estables alrededor de 1 año.
- Preparación del [9, 10- ^3H] oleato de colesterol tibio: debe prepararse la solución comercial

para obtener una radiactividad final de entre 15.000 y 30.000 dpm por cada 25 μL de cloroformo. Además, la disolución debe contener también 5 μg de colesterol oleato frío por cada 25 μL de cloroformo.

Se almacena a -20°C , se descongela para cada experimento a temperatura ambiente antes de su uso y una vez terminado se vuelve a congelar.

Actividad de la colesterol ester hidrolasa (CEH)

- Lecitina (100 mg/mL de cloroformo/metanol).
- Taurocolato sódico.
- [^{14}C]oleato de colesterol (250 μCi ; 56 mCi/mmol).
- Oleato de colesterol.
- Tampón imidazol-HCl 0,1 M pH = 6,8.
- Líquido de extracción del oleico (375 mL de cloroformo; 423 mL de metanol; 300 mL de n-heptano; 30 μL de ácido oleico [$p = 0,89$ g/mL]).
- Disolución de sales (Na_2BO_3 50 mM/ Na_2CO_3 50 mM): 1 g de NaOH + 1,5 g de H_3BO_3 + 2,65 g Na_2CO_3 en agua hasta 500 mL.
- Líquido de centelleo.
- Preparación de liposomas (substrato): [^{14}C]oleato de colesterol:lecitina:taurocolato sódico en proporción molar 1:4,7:2,5. En un tubo de vidrio se mezclan:
 - 112 μL de lecitina (100 mg/mL cloroformo/metanol).
 - 72 μL de oleato de colesterol (30 mg/mL tolueno).
 - 168 μL de taurocolato sódico (25,6 mg/mL metanol).
 - 150 μL de [^{14}C]oleato de colesterol.

Se evapora a sequedad con corriente de N_2 . Se añade 8 mL de tampón imidazol-HCl 0,1 M. Se sonica 30 min en baño de agua caliente a unos 50°C (10 min sonicando y 5 min descanso, 3 veces) y se centrifuga a 2.500 rpm 10 min (es estable hasta 10 días a 4°C).

Protocolo

Preparación de microsomas

Se pesa 1 g de hígado bien troceado y se coloca en un homogenizador de vidrio que contiene 5 mL de tampón de microsomas. Todo se realiza en baño de hielo hasta el final para evitar

la degradación de las enzimas. Se homogeniza bien y se trasvasa a un tubo de centrifuga. Se limpia el homogeneizador con 2 mL de tampón de microsomas frío y se añade el mismo al tubo de centrifuga.

El homogenado se centrifuga a 20.000 g durante 20 min a 4 °C. Se recoge el sobrenadante y éste se centrifuga a 100.000 g durante una hora a 4 °C. El nuevo sobrenadante se guarda para la determinación de la actividad de la colesterol ester hidrolasa citosólica y el precipitado se resuspende en 6 mL de tampón de microsomas y se vuelve a centrifugar a 100.000 g durante 1 hora a 4 °C.

Se desecha el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 1,2 mL de tampón de microsomas. Para la resuspensión se utilizan microperforadores de 19 y 25 G. Primero se pasa por el de 25 G tres veces y después por el de 19 G tres veces. Una vez resuspendidos, se hacen alícuotas en tubos Eppendorf y se almacenan a -80 °C hasta su utilización.

Dado que la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo del colesterol se expresa referida a mg de proteína microsomal, es necesario cuantificar la cantidad de proteínas presente en la muestra obtenida.

Tras diluir la muestra de microsomas 1:10 con agua destilada, se sigue el método Bradford descrito en la práctica correspondiente a capacidad lipogénica.

Actividad de la hidroximetil-glutaril coenzima A reductasa (HMGCoAR)

La muestra de microsomas se descongela el mismo día y se deja en refrigeración. Durante el desarrollo de la técnica, las muestras se mantienen en un baño de hielo salvo en las incubaciones que se indican a continuación.

Se añaden 100 µL de tampón A a las muestras y 150 µL a los blancos, y 20 µL de la fosfatasa (0,5 U) a las muestras.

A continuación, se añaden a las muestras 30 µL de microsomas (conteniendo 130 µg de proteína en rata o 300-400 µg de proteína en hámster). Si fuera necesario se puede variar los volúmenes de tampón para añadir la muestra necesaria.

Se agitan los tubos, se ponen en un baño con agitación durante 1 hora a 37 °C, y a continuación se introducen en un baño de hielo.

Más tarde se añade la HMG-CoA tibia (20 µL, 19,6 nmoles/tubo) y 30 µL de NADPH (0,7 g), tanto a las muestras como a los blancos. Se agitan los tubos, se ponen en un baño con agitación durante 10 min a 37 °C, y se introducen en un baño de hielo de nuevo. A continuación se añaden 30 µL de HCl 10 N a todos los tubos. Se agitan los tubos, se vuelven a poner en un baño con agitación durante 1 hora a 37 °C.

Posteriormente, se añaden 20 µL de ³H MVN (10.000 dpm) a todos los tubos. Se dejan reposar los tubos durante una noche (mínimo) a temperatura ambiente.

Después es necesario realizar una cromatografía en columna de resina AG1-X8. Para ello, se toman pipetas Pasteur de rama corta o cortadas en las cuales se habrá colocado previamente, con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio de rama larga, una pequeña bola de lana de vidrio. Se traza una línea sobre cada pipeta, a una altura de 5 cm sobre la lana. Se ponen las pipetas en un soporte con pinzas (Fig. P9-1) y se coloca debajo un vial para recoger el agua de preparación.

Se hace fluir agua en cada pipeta a fin de impregnar la lana. Antes de que todo el agua salga de la pipeta, y con la ayuda de otra pipeta Pasteur cortada, se rellenan las pipetas con la resina (pre-



Figura P9-1. Montaje de la columna de resina AG1-X8.

parada tomando una cantidad de la resina y mezclándolo con agua destilada) hasta la marca de los 5 cm. A continuación se añaden unas gotas de HCl 10 N para facilitar el paso de la muestra a lo largo de la columna. Se verifica la ausencia de fisuras en la columna o burbujas de aire debajo de la lana.

Se deposita, con ayuda de una pipeta Pasteur, gota a gota, y en la pared de la columna el contenido total de cada muestra (250 μL) y se recoge el eluido en el vial de contaje 1. El contenido radiactivo no debe salir de la columna por el momento. Se añaden 0,5 mL de agua destilada y se recoge el eluido en el vial 2. Se eluye la mevalonolactona (^3H y ^{14}C) con 3 lavados de 0,5 mL de agua destilada y se recogen el vial 3. Este vial contiene la radiactividad. Se utiliza un último vial (4), para limpiar la columna con 1 mL de agua destilada, para asegurarse de que en esta fase no sale radiactividad.

Se añade a todos los viales 10 mL de líquido de centelleo, se agitan bien y se cuenta la radiactividad de todos los tubos excepto el patrón de ^{14}C en una ventana dual. Este patrón se lee en el programa de ^{14}C por si hubiera contaminación de lectura entre las ventanas ^3H y ^{14}C .

Se debe determinar la actividad de la solución tibia realizada midiendo las cuentas radiactivas de 20 μL de disolución tibia en 10 μL de líquido de centelleo (125.000 dpm aproximadamente).

Actividad de la acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT)

Se enfrían en un baño de hielo tubos de plástico con tapón, resistentes al cloroformo. Todas las operaciones descritas a continuación se realizan en un baño de hielo, salvo las incubaciones a mayor temperatura. Se deben preparar tubos para las muestras y para los blancos.

En tubos de vidrio, se añaden 100 μL de tampón fosfato a muestras y blancos y 20 μL de BSA a todos los tubos. Además, se añade agua destilada a muestras y a blancos, considerando el volumen de muestra que se va a incluir (cantidad suficiente para 400 μg de proteína en hámster o 200 μg de proteína en rata). El volumen final debe ser 80 μL , tanto en muestras como en blancos.

Se calienta la muestra de microsomas con las manos para que la temperatura se eleve, pero no

más de 10 $^{\circ}\text{C}$. Se añade la muestra de microsomas a los tubos muestra. Se introducen los tubos en un baño a 37 $^{\circ}\text{C}$ con agitación (200 ciclos/min) y se incuban cada tubo 5 minutos. Se calienta el Oleoyl-CoA [$1-^{14}\text{C}$] con las manos.

Se añaden 25 μL de Oleoyl-CoA [$1-^{14}\text{C}$] a todos los tubos y éstos se introducen en un baño a 37 $^{\circ}\text{C}$ con agitación (180 ciclos/min), y se incuban 10 minutos. Este proceso se desfasa de un tubo a otro, como mínimo 30 segundos.

Se añaden 5 mL de cloroformo:metanol (2:1), 25 μL de [$9, 10-^3\text{H}$] oleato de colesterol tibio y 1,25 mL de KCl 0,1 M a todos los tubos, respetando el desfase de tiempos. El metanol debe pasar a la fase acuosa, para lo que se debe mezclar a baja velocidad.

Se centrifuga a 3.000 g durante 5 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. Se recoge una alícuota de 2,5 mL de la fase clorofórmica, se evapora a sequedad con corriente de nitrógeno y se resuspende en 150 μL de cloroformo.

Para identificar el oleato de colesterol se hace una TLC utilizando hexano/acetato de etilo (9:1) (v/v).

- 1 carril con 75 μL de [^3H]oleato de colesterol.
- 3 carriles con 150 μL de muestra por carril.

La placa de TLC se calienta durante 30-60 minutos a 60-90 $^{\circ}\text{C}$ antes de aplicar la muestra. Este paso es necesario para eliminar la posible humedad de la placa que interfiere con la separación del colesterol oleato.

Se añade a la cubeta de cromatografía el solvente de acetato de etilo/hexano (1:9) (v/v) (100-200 mL), tras lo cual se introduce un papel de filtro del tamaño de la placa de TLC. Se deja unos 30 minutos para que en el tanque se cree un ambiente de saturación. Es importante no dejar mucho más tiempo, ya que la mezcla de solventes puede cambiar debido a pequeñas evaporaciones.

Se migra la placa durante 35 minutos y se hace una marca para indicar hasta dónde ha migrado el disolvente. Transcurrido este tiempo se saca la placa, se seca con secador y se vuelve a repetir la TLC hasta que el disolvente llegue a la marca (también unos 35 minutos).

Se revela la placa con vapores de yodo. Para ello, se coloca en el fondo de una cubeta de cromatografía cantidad suficiente de yodo sólido para crear una atmósfera de saturación. A continuación se colocan las placas en su interior. Se

deja revelar 3 o 4 minutos, hasta que se vean las manchas. Esta operación ha de hacerse en campana. Se cortan con tijeras las manchas correspondientes al oleato de colesterol y se introducen en un vial de contaje. Se añaden 10 mL de líquido de centelleo en cada vial y se agita. Los viales se leen con un programa dual $^3\text{H}/^{14}\text{C}$.

Además de los viales de las muestras, se preparan cuatro viales, dos con 25 μL de [^{14}C]oleoil CoA líquido (A) y dos con [9, 10- ^3H] oleato de colesterol tibio (B) más 10 mL de líquido de centelleo, que se leerán en el mismo programa.

Actividad de la colesterol ester hidrolasa (CEH)

Se deben añadir 300-400 μg de proteína microsomal o 1.500-2.500 μg de proteína citosólica en un volumen final de 0,3 mL con tampón imidazol. Los blancos se realizarán directamente con 0,3 mL de tampón imidazol. Se preincuban todos los tubos durante 10 min a 37 °C.

Se añaden 0,1 mL de sustrato a todos los tubos y se incuban durante 30-45 min a 37 °C con agitación. Se debe aplicar un desfase de, por ejemplo, 30 segundos entre tubos para asegurar que la reacción se detiene al mismo tiempo en todos los tubos.

Se añaden 5 mL del líquido de extracción y, posteriormente, 1 mL de la disolución de sales a todos los tubos. Se agitan los tubos vigorosamente, de forma manual, durante 1 minuto.

Se centrifuga 10 minutos para separar las fases acuosa y orgánica a 1.500 rpm. Se toman 1,5 mL de la fase superior (que es de 3,1 mL) y se llevan a viales con 4 mL de líquido de centelleo.

Todo el proceso ha de hacerse en tubos de plástico que resisten el cloroformo y el heptano, con tapa.

En el caso de que haya que aumentar el volumen de muestra para conseguir la cantidad adecuada de proteína, se puede reducir algo el volumen de tampón.

Si la actividad enzimática sale muy baja se puede aumentar la cantidad de proteína o aumentar la concentración del sustrato reduciendo el volumen de tampón. También se puede aumentar el tiempo de incubación. Todos estos cambios deben tenerse en cuenta en los cálculos finales.

Cálculos

Actividad de la hidroximetil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoAR)

El cálculo se realiza de la siguiente manera:

$$\text{pmol de mevalonato/min/mg proteína microsomal} = \frac{(\text{dpm corregidas} \times 19,6 \text{ nmol} \times 1.000)}{(\text{mg proteína} \times \text{min} \times \text{dpm HMG-CoA tibio})}$$

- dpm corregidas: $(\text{dpm reales} \times 100) / \text{rendimiento de la columna}$.
- dpm reales: $\text{dpm muestra} - \text{dpm blanco}$.
- Rendimiento de la columna $(\text{dpm patrón interno de la muestra} \times 100) / \text{dpm patrón interno}$.
- dpm del HMG-CoA tibio: corresponde a la radiactividad de 20 μL de disolución tibia HMG-CoA.

Datos de referencia:

Hámster: 30-40 pmol/mg proteína/min

Rata: 50-200 pmol/mg proteína/min

Actividad de la acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT)

El cálculo se realiza de la siguiente manera:

$$\text{pmol de oleato de colesterol/min/mg de proteína} = \frac{(12.477 \times \text{dpm corregidas de la muestra} \times 3,3)}{(\text{dpm del sustrato (A)} \times \text{min} \times \text{mg proteína} \times 2,5)}$$

- dpm corregidas: $(\text{dpm } [^3\text{H}]\text{oleato de colesterol añadido a la muestra (B)} \times [^{14}\text{C}]\text{oleato de colesterol producido}) / \text{dpm } [^3\text{H}]\text{oleato de colesterol recuperados en la determinación}$.

Datos de referencia:

Hámster: 18-20 pmol/mg proteína/min

Rata: 22-65 pmol/mg proteína/min

Actividad de la colesterol ester hidrolasa (CEH)

El cálculo se realiza de la siguiente manera:

$$\text{pmol ácido oleico/mgprot/min} = \frac{(\text{cpm muestra} - \text{cpm blanco}) \times 100 \times 3,1 \times 45.000 (\text{pmol añadidos})}{\text{cpm totales} \times \% \text{ extracción} \times 1,5 \times \text{mg proteína} \times \text{tiempo}}$$

- cpm totales: se obtiene añadiendo directamente 0,1 mL del sustrato al vial de centelleo.

El % de extracción se refiere al ácido oleico que realmente se recoge en la fase acuosa y se calcula utilizando como sustrato unas vesículas preparadas como las anteriores, pero que en lugar de oleato de colesterol y [^{14}C]oleato de colesterol contiene ácido oleico y [^3H]oleico. Suele ser de entorno al 85%.

Datos de referencia

Hámster: 30-40 pmol/mg proteína/min

Rata: 50-200 pmol/mg proteína/min

BIBLIOGRAFÍA

- Ochoa B, Gee A, Jackson B, Suckling KE (1990). Regulation of cholesteryl ester metabolism in the hamster liver. *Biochim Biophys Acta* 1044:133-138.
- Philipp BW, Shapiro DJ (1979). Improved methods for the assay and activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Lipid Res* 20:588-593.
- Smith, JL, de Jersey J, Pillay SP, Hardie IR (1986). Hepatic acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. Development of a standard assay and determination in patients with cholesterol gallstones. *Clin Chim Acta* 158:271-282.
- Smith, JL, Lutton C (1997). Determination of hepatic acyl-coenzyme A-cholesterol acyltransferase activity in LPN hamsters: a model for cholesterol gallstone formation. *J Gastroenterol Hepatol* 12:877-886.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Actividad enzimática	
HMGCoAR (pmol/mg proteína/min)	
ACAT (pmol/mg proteína/min)	
CEH (pmol/mg proteína/min)	



COMENTARIOS

Influencia de la fibra sobre el nivel de colesterol en hígado y heces

N. Boqué Terre y M. A. Zulet Alzórriz

INTRODUCCIÓN

La ingesta de una dieta rica en colesterol y con una relación elevada en ácidos grasos saturados/insaturados aumenta el nivel de colesterol sanguíneo y favorece el desarrollo de la lesión aterosclerótica, lo cual causa un elevado número de muertes en los países desarrollados.

El colesterol es sintetizado en el hígado y transformado en ácidos biliares, los cuales se almacenan en la vesícula biliar. Cuando los alimentos ingeridos llegan al duodeno, la bilis es excretada al intestino para facilitar la digestión y absorción de las grasas alimentarias. Aproximadamente un 10% de la bilis se excreta a través de las heces (facilitando la eliminación del exceso de colesterol del organismo) y un 90% regresa a la circulación enterohepática.

Por otra parte, una dieta rica en fibra puede disminuir los niveles de colesterol plasmático ya que favorece su excreción a través de las heces, arrastrando tanto colesterol dietético como ácidos biliares. Además, la fibra puede reducir el riesgo de cardiopatía coronaria al disminuir los lípidos séricos, la tensión arterial y la glucosa plasmática.

OBJETIVO

Comparación de los niveles de colesterol en hígado y heces de ratas alimentadas con una dieta lipídica frente a otras alimentadas con una dieta rica en fibra.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Se basa en el uso de tres enzimas: colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa. En presen-

cia de esta última la mezcla de fenol y 4-aminoantipirina se condensan por acción del peróxido de hidrógeno, formando una quinonaimina coloreada proporcional a la concentración de colesterol en la muestra.

Material y equipos

Muestras y/o material biológico

- Hígado y heces de ratas.

Equipos

- Jaulas metabólicas.
- pHmetro.
- Sonicador.
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro.
- Agitador orbital Shaker.

Material

Determinación de colesterol en hígado

- Baño de agua.
- Balanza.
- Vortex.
- Probeta.
- Vaso de precipitados.
- Pipetas.
- Bisturí.
- Tubos Falcon 15 mL.
- Eppendorf 2 mL.
- Hielo.
- Hielo seco.

Determinación de colesterol en heces

- Baño de agua.
- Estufa.
- Balanza.
- Bala de nitrógeno.
- Molinillo.
- Vortex.
- Pipetas.
- Tubos Falcon 15 mL.
- Eppendorf 2 mL.
- Papel de filtro.

Reactivos*Determinación de colesterol en hígado*

- Agua destilada.
- Kit colesterol: colesterol esterasa, colesterol oxidasa, peroxidasa, fenol, 4-aminoantipirina y solución patrón.
- Cloruro sódico.
- Tritón X-100.
- Tris (pH 8)

Determinación de colesterol en heces

- Agua destilada.
- Kit colesterol: colesterol esterasa, colesterol oxidasa, peroxidasa, fenol, 4-aminoantipirina y solución patrón.
- Cloruro sódico.
- Tritón X-100.
- Cloroformo.
- Metanol.
- n-Hexano.
- Etanol.
- Hidróxido de potasio.

Dietas**Dieta rica en lípidos (A)**

Caseína 20%
Colina 0,2%
Mezcla mineral 4%
Mezcla vitamínica 1%
Metionina 0,4%
Azúcar 48%
Colesterol 1%
Aceite de coco 25%
Ácido cólico

Dieta rica en fibra (B)

Caseína 20%
Colina 0,2%
Mezcla mineral 4%
Mezcla vitamínica 1%
Metionina 0,4%
Azúcar 32%
Almidón 32%
Aceite de oliva 5%
Celulosa 5%

Protocolo

Los animales se deben mantener durante un período de 2-3 días de aclimatación en jaulas de metabolismo, antes de alimentarlos con las dietas de estudio. Posteriormente, se dividirán las ratas en dos grupos: dieta A y dieta B. A cada grupo se le alimentará con la dieta correspondiente durante 30 días y se recogerá la excreción fecal de los 3 últimos días, al cabo de los cuales se sacrificarán los animales y se extraerá el hígado.

Determinación de colesterol en hígado

- Preparar buffer (1,5 mL por muestra)
 - 150 mM cloruro sódico
 - 0,1% Tritón X-100
 - 10 mM tris (pH 8)
- Poner 1,5 mL de buffer en tubos Falcon (uno por muestra) y calentar a 50 °C.
- Pesar aproximadamente 150 mg de hígado (usar hielo seco para evitar que la muestra se descongele) y echarlo en su correspondiente tubo con buffer.
- Sonicar durante 30-40 segundos, hasta que la muestra esté totalmente disuelta en el buffer. Guardarlas en hielo.
- Una vez sonicadas todas las muestras, retirarlas del hielo y dejarlas atemperar.
- Pasar a Eppendorf y centrifugar durante 10 minutos a 12.000 g (rcf).
- Pasar a un nuevo tubo, eliminando el pellet.
- Homogeneizar con vortex durante unos segundos.
- Equilibrar los reactivos del kit a temperatura ambiente
- Se cogen las siguientes cantidades en μL :

Tubos	Blanco	Patrón	Muestra
Monoreactivo	1 mL	1 mL	1 mL
Muestra	–	10 μL	–
Patrón	–	–	10 μL

- Mezclar y reposar los tubos 10 minutos a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia (A) de la muestra y el patrón a 500 nm frente al blanco de reactivo, en el espectrofotómetro.

Cálculos

$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} = \text{mg/dL colesterol total}$$

Las muestras con concentraciones superiores a 600 mg/dL deben diluirse 1:2 con solución salina y repetir el ensayo. Multiplicar los resultados por 2.

Para expresar los resultados en unidades SI aplicar:

$$\text{mg/dL} \times 0,0259 = \text{mmol/L}$$

Determinación de colesterol en heces

- Se pesan de 0,5 a 2 g de heces.
- A partir de 100 mg de heces secadas y pulverizadas, se extraen los lípidos por el método de Folch:
 - Se añaden 20 volúmenes de cloroformo-metanol (2:1 vol/vol), en este caso 2 mL.
 - Se deja durante 15 minutos en un agitador orbital.
 - Se filtra para quedarnos con la fase líquida.
 - Se añaden 4 volúmenes de NaCl 0,9% (400 µL).
 - Se vortea y se dejan separar las 2 fases (fase inferior: cloroformo + lípidos).
 - Se elimina la parte superior con una pipeta.
 - Se lava 2 veces con 2 mL de metanol/agua/cloroformo (94:96:4).
 - Añadir metanol hasta 5 mL, para que forme una única fase con la mezcla de lavado.
 - Centrifugar durante 10 minutos a 400 g y recoger 1 mL de la parte inferior en otro tubo.
 - Finalmente se seca la muestra bajo nitrógeno.
- Saponificar con 2 mL de KOH 1 M disuelto en metanol a 50 °C durante 60 minutos.
- Dejar enfriar y añadir 2 mL de agua destilada.
- Extraer el colesterol con 2 mL de n-hexano.
- Evaporar el solvente bajo nitrógeno.
- Resuspender en 500 µL de EtOH (1% Triton X-100).
- Equilibrar los reactivos del kit a temperatura ambiente.

- Se cogen las siguientes cantidades en µL:

Tubos	Blanco	Patrón	Muestra
Monoreactivo	1 mL	1 mL	1 mL
Muestra	–	10 µL	–
Patrón	–	–	10 µL

- Mezclar y reposar los tubos 10 minutos a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia (A) de la muestra y el patrón a 500 nm frente al blanco de reactivo, en el espectrofotómetro.

Cálculos

$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} = \text{mg/dL colesterol total}$$

Las muestras con concentraciones superiores a 600 mg/dL deben diluirse 1:2 con solución salina y repetir el ensayo. Multiplicar los resultados por 2.

Para expresar los resultados en unidades SI aplicar:

$$\text{mg/dL} \times 0,0259 = \text{mmol/L}$$

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson JW, Baird P, Davis RH Jr, Ferreri S, Knudson M, Koraym A, Waters V, Williams CL (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev* 67:188-205.
- Cervera P, Clapés J, Rigolfas R (1998). Alimentación y dietoterapia. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Maki KC, Beiseigel JM, Jonnalagadda SS, Gugger CK, Reeves MS, Farmer MV, Kaden VN, Rains TM (2010). Whole-grain ready-to-eat oat cereal, as part of a dietary program for weight loss, reduces low-density lipoprotein cholesterol in adults with overweight and obesity more than a dietary program including low-fiber control foods. *J Am Diet Assoc* 110:205-14.
- Zhang J, Liu J, Li L, Xia W (2008). Dietary chitosan improves hypercholesterolemia in rats fed high-fat diets. *Nutr Res* 28:383-90.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se expresan en mg de colesterol/g de hígado o heces.

	Dieta rica en lípidos	Dieta rica en fibra
Colesterol en hígado (mg/g hígado)		
Colesterol en heces (mg/g heces)		



COMENTARIOS

Evaluación de la calidad nutritiva de las proteínas: índices químicos e índices biológicos

M. T. Macarulla Arenaza y M. P. Portillo Baquedano

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son el constituyente principal de las células y resultan imprescindibles para el crecimiento, la reparación y la continua renovación de los tejidos corporales. Además, tienen también funciones reguladoras vitales y pueden ser utilizadas con fines energéticos.

Sin embargo, el organismo no puede aprovechar totalmente la proteína que se ingiere con la dieta porque su digestión y absorción suelen ser incompletas, y porque la eficacia de la utilización de los aminoácidos en el proceso de síntesis proteica no siempre es óptima. Por ello surge el término de **calidad de la proteína**, que depende de dos factores: su composición y su digestibilidad. El primero se refiere a su contenido en los aminoácidos esenciales (aquellos que el organismo no es capaz de sintetizar), mientras que la digestibilidad (que se define como la fracción ingerida que es digerida y absorbida) varía en función de la estructura de la misma proteína (globular o fibrosa), de otros componentes que la acompañen (fibra, inhibidores de enzimas digestivos, etc.), del procesado del alimento, de la relación energía-proteína, etc., y de las características propias del individuo que la ingiere (edad, estado fisiológico, etc.).

Por tanto, a la hora de diseñar una dieta se hace necesario conocer la calidad nutritiva de las fuentes proteicas, calidad que se evalúa a través de los índices nutritivos químicos y biológicos. Los índices químicos proteicos se refieren a la composición en aminoácidos esenciales de las proteínas, y con ellos se determina si una proteína es completa o incompleta. **Proteína completa** es la que contiene todos los aminoácidos esenciales en proporciones adecuadas a las necesidades, mien-

tras que **proteína incompleta** es la que, o bien carece de algún aminoácido esencial, o bien contiene todos los esenciales pero alguno/os en proporciones insuficientes.

Los índices biológicos proteicos se determinan a través de ensayos con animales en crecimiento, midiendo las tasas de nitrógeno que ingieren y de nitrógeno que excretan por heces y por orina.

En la actualidad, el método más empleado para evaluar la calidad proteica es una combinación de ambos, el denominado **Cómputo químico de aminoácidos corregido por la digestibilidad proteica** o PDCAAS (por *Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score*).

OBJETIVO

El objetivo de la presente práctica es evaluar la calidad nutritiva de la proteína de diferentes alimentos y de la proteína resultante de mezclas de alimentos mediante el cálculo del Cómputo químico (CQ) y el Cómputo químico corregido por digestibilidad proteica (PDCAAS), así como evaluar la calidad nutritiva de dos proteínas de distinto origen a través de la determinación de sus índices biológicos utilizando ratas en crecimiento.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Índices químicos

El índice químico proteico más habitual es el Cómputo químico (CQ o CS por *Chemical Score*), que se define como “la relación existente entre la

cantidad del aminoácido limitante en la proteína del alimento y la cantidad de ese aminoácido en la proteína patrón". El aminoácido limitante es el aminoácido esencial de la proteína a evaluar más deficitario con relación a las necesidades, y la proteína patrón, que anteriormente era la proteína del huevo, actualmente es una proteína hipotética establecida por la FAO/OMS que consiste en una mezcla de los aminoácidos esenciales en las proporciones necesarias para los niños de 2 a 5 años (Tabla P11-1).

Sin embargo, puesto que la calidad de una proteína también está determinada por la capacidad del organismo de digerirla y absorber sus aminoácidos, es decir, por su digestibilidad (ver más adelante *Índices biológicos*), es más útil el Cómputo químico de aminoácidos corregido por la digestibilidad proteica (PDCAAS).

No obstante, en términos de alimentación habitual no se puede considerar la calidad de las proteínas de un alimento aislado, puesto que usualmente se mezclan alimentos con distintos tipos de proteínas. Por ello, si la combinación de dos o más alimentos suministra proteínas que se complementan en sus aminoácidos deficitarios, el resultado es una proteína de mejor calidad que si se considera por separado.

Índices biológicos

Para determinar estos índices se utilizan animales en crecimiento estabulados individualmente en jaulas de metabolismo, lo que permite medir su ingesta de dieta y recoger separadamente sus heces y orinas. La valoración del contenido en nitrógeno de la dieta, las heces y la orina permite calcular la cantidad de nitrógeno ingerido, fecal y urinario (asumiendo que todo él es de origen proteico), necesarios para calcular los diferentes índices. La determinación del nitrógeno de las muestras se realiza mediante el método de Kjeldahl, que se basa en la liberación y conversión del grupo amino de los aminoácidos en amoníaco, y su posterior valoración con ácido clorhídrico una vez destilado.

Los índices biológicos proteicos más utilizados son (Fig. P11-1):

- Balance de nitrógeno (BN) o **cantidad de nitrógeno retenido**, expresado en gramos. Es indicativo del incremento de proteína corporal.
- Coeficiente de digestibilidad proteica (CDP) o **proporción de nitrógeno absorbido respecto al total ingerido**, expresado en %. Es indicativo del grado de digestión y absorción.

Tabla P11-1. CONTENIDO EN PROTEÍNA TOTAL (G) Y EN AMINOÁCIDOS ESENCIALES (MG) POR 100 G DE PORCIÓN COMESTIBLE¹ Y DIGESTIBILIDAD PROTEICA (%)² DE ALGUNOS ALIMENTOS, Y PERFIL AMINOACÍDICO (MG/G) DE LA PROTEÍNA PATRÓN³

Alimentos	Proteína	His	He	Leu	Lys	Met+Cys	Phe+Tyr	Thr	Trp	Val	Digestibilidad
Huevo	10,9	290	661	1016	806	686	1143	449	125	809	97
Leche	3,2	75	165	265	140	92	299	143	75	192	95
Pollo	20,8	625	1063	1534	1725	837	1500	869	237	1020	94
Merluza	18,8	555	868	1532	1731	760	1372	826	211	971	94
Gelatina	85,6	662	1158	2454	3460	606	2040	1475	0	2081	95
Lentejas	24,9	702	1078	1809	1740	539	1897	895	223	1238	85
Nueces	21,9	611	714	1517	620	485	1732	700	198	825	85
Arroz	7,1	168	308	589	258	314	619	255	83	435	88
Pan	11,7	211	374	686	295	387	677	284	121	428	87
Maíz	9,4	287	337	1155	265	367	846	354	67	477	89
Proteína patrón	-	19	28	66	58	25	63	34	11	35	-

¹ NutritionData

² Boutrif (1991)

³ Millward *et al* (2008)

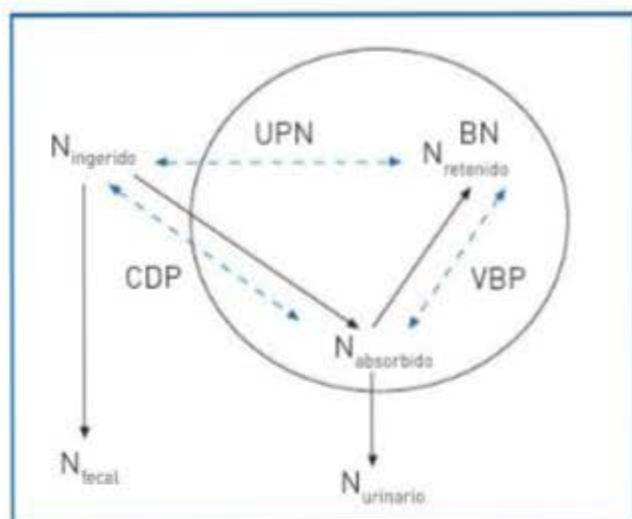


Figura P11-1. Esquema de los principales índices biológicos de proteínas.

- Valor biológico proteico (VBP) o **proporción de nitrógeno retenido respecto al total absorbido**, expresado en %. Proporciona información de la medida en la que los requerimientos de los aminoácidos esenciales quedan cubiertos por la proteína digerida y absorbida, puesto que un déficit de cualquiera de ellos impide que la síntesis proteica se realice convenientemente, provocando así que la retención de nitrógeno sea inadecuada.
- Utilización proteica neta (UPN) o **proporción de nitrógeno retenido respecto al total ingerido**, expresado en %. Este índice engloba a los dos anteriores, puesto que $UPN = (VB \times CD)/100$, por lo que es indicativo del grado total de aprovechamiento de la proteína.
- Índice de eficacia proteica (PER, por *Protein Efficiency Ratio*) o **relación entre el incremento de peso corporal (ΔPC) y la cantidad de proteína ingerida**, expresado en g/g. Indica de modo global si la proteína ingerida es adecuada para cubrir las necesidades proteicas de los individuos en crecimiento.

Material y equipos

Índices químicos

Material

- Tablas de composición de alimentos que contengan datos del contenido en aminoácidos.

Índices biológicos

Material biológico

- Ratas en crecimiento.

Equipos

- Jaulas de metabolismo (Fig. P11-2).
- Manta calefactora de digestión.
- Campana extractora de gases.
- Equipo de destilación de Kjeldahl.
- Balanzas.

Material

- Vidrios de reloj.
- Tubos de digestión.
- Embudos.
- Pipetas.
- Probetas.
- Erlenmeyers.
- Buretas.
- Pipetas Pasteur.
- Morteros.
- Frascos de recogida de muestras.
- Espátulas.
- Pies, pinzas y nueces.

Reactivos

- Dietas con proteína de diferente origen (A y B): se pueden utilizar dieta purina chow (las fuentes proteicas son trigo, avena, alfalfa, maíz y soja) y dieta comercial purificada (la fuente proteica es caseína suplementada con L-cisteína).
- H_2SO_4 (c).
- Catalizador: puede ser comercial o una mezcla de $KHSO_4$ y $CuSO_4$ en proporción 50:1.
- NaOH al 40%.
- H_3BO_3 al 4%.
- Indicador Shiro-Tashiro (pH 5,6): se prepara mezclando en proporción 1:1 disoluciones etílicas de rojo de metilo al 0,2% y azul de metileno al 0,1%. Presenta coloración rosa-violeta a pH inferior a 5,6 y verde por encima del mismo.
- HCl 0,1 N titulado.



Figura P11-2. Esquema de una jaula de metabolismo.

Protocolo

Índices químicos

Con los datos de la tabla de composición de alimentos (Tabla P11-1) se calcula, para cada alimento, su contenido en cada aminoácido esencial, o grupos de ellos como en el caso de los aminoácidos azufrados (Met+Cys) y en el de los aromáticos (Phe+Tyr), expresado en miligramos por gramo de proteína.

Para cada aminoácido se calcula su relación con el contenido establecido en la proteína patrón utilizando la fórmula del CQ:

$$CQ = \frac{\text{mg AA limitante/g de proteína del alimento}}{\text{mg AA limitante/g de proteína patrón}} \times 100$$

El aminoácido que presente la menor relación es el aminoácido limitante de la proteína, y dicha relación es la que se considera como el **cómputo químico** de la misma. Si las relaciones de todos los aminoácidos son $\geq 100\%$ se considera que la proteína es completa y, por tanto, no tiene ningún aminoácido limitante.

Para calcular el PDCAAS de la proteína se multiplica su CQ por el valor de su digestibilidad (Tabla P11-1), y se divide entre 100.

Para calcular el CQ y el PDCAAS de mezclas de dos o más fuentes proteicas se procede de la siguiente manera:

a) Considerada una mezcla, por ejemplo de lentejas y arroz en proporción 4:1, se calcula cuánta proteína aporta a la mezcla cada alimento. Para facilitar los cálculos se puede considerar que dicha mezcla está constituida por 400 g de lentejas y 100 g de arroz (si se utilizan otros valores, por ejemplo, 100 g de lentejas y 25 g de arroz, los resultados no cambian). En este caso:

- las lentejas aportan $400 \times 24,9/100 = 99,6$ g de proteína
- el arroz aporta $100 \times 7,1/100 = 7,1$ g de proteína.

b) Identificados previamente los aminoácidos limitantes de cada componente de la mezcla, en este caso Met+Cys para las lentejas y Lys para el arroz, se calcula cuánto aporta cada alimento de cada uno de ellos a la mezcla. En este caso:

- las lentejas aportan:
 - $400 \times 539/100 = 2.156$ mg de Met+Cys
 - $400 \times 1.740/100 = 6.960$ mg de Lys
- el arroz aporta:
 - $100 \times 314/100 = 314$ mg de Met+Cys
 - $100 \times 258/100 = 258$ mg de Lys

c) Se calcula para cada aminoácido su contenido en la mezcla expresado en miligramos por gramo de proteína. En este caso:

- Met+Cys: $(2.156 + 314)/(99,6 + 7,1) = 23$ mg/g de proteína mezcla
- Lys: $(6960 + 258)/(99,6 + 7,1) = 68$ mg/g de proteína mezcla

d) Se aplica la fórmula anterior a cada aminoácido para calcular su relación con el contenido de la proteína patrón. En este caso:

- Met+Cys: $23/25 \times 100 = 92\%$
- Lys: $68/58 \times 100 = 117\%$

e) El CQ de la proteína de la mezcla es la relación que presente menor valor. En este caso, por tanto, el CQ será 92%, y el aminoácido limitante será el grupo Met+Cys.

f) Para calcular el PDCAAS de la proteína de la mezcla se necesita conocer su digestibilidad. Para ello se recurre a la ley de mezclas, es decir, se utilizaría la siguiente fórmula:

$$\text{Digestibilidad}_{\text{Mezcla}} = \left[\frac{(\text{Proteína}_{\text{Lentejas}} \times \text{Digestibilidad}_{\text{Lentejas}}) + (\text{Proteína}_{\text{Arroz}} \times \text{Digestibilidad}_{\text{Arroz}})}{(\text{Proteína}_{\text{Lentejas}} + \text{Proteína}_{\text{Arroz}})} \right]$$

- g) Por último, se determina el PDCAAS de la proteína de la mezcla utilizando los valores de cómputo químico y de digestibilidad calculados.

Nota: Se pueden diseñar mezclas de los mismos alimentos en diferentes proporciones para tratar de mejorar su CQ e incluso lograr proteínas completas (CQ \geq 100%), como por ejemplo lentejas y arroz en proporción 1:1.

Índices biológicos

1. Antes de comenzar el período experimental, se determina el contenido proteico de las dietas experimentales (A y B) a través del análisis de su contenido en nitrógeno, siguiendo el método que se describe a continuación. El contenido en proteína de cada dieta (que se expresa en %), se calcula multiplicando su contenido en nitrógeno por el factor 6,25, puesto que, por término medio, las proteínas contienen un 16% en peso de nitrógeno.
2. Se escogen ratas en crecimiento del mismo sexo y edad, se pesan, se colocan distribuidas en dos grupos (A y B) en jaulas metabólicas individuales, y a cada rata se le ofrece en el comedero una cantidad fija de la dieta correspondiente (por ejemplo, 40 g).
3. Durante al menos una semana, diariamente se pesa cada animal, se mide su ingesta de dieta y se recogen sus heces y orina, que se van guardando en congelador.
4. El último día se mide la excreción total de heces y de orina de cada animal, y se determina el contenido en nitrógeno de sus heces (previamente trituradas) y orinas (previamente filtradas), como se describe a continuación.
5. Teniendo en cuenta las cantidades totales de dieta ingerida y de heces y orina excretadas, para cada rata se calculan los valores de N_{ingerido} , N_{fecal} y N_{urinario} y con ellos los diferentes **Índices nutritivos biológicos** utilizando las siguientes fórmulas:

$$BN = N_{\text{retenido}} = N_{\text{ingerido}} - N_{\text{eliminado}} = N_{\text{ingerido}} - (N_{\text{fecal}} + N_{\text{urinario}})$$

$$CDP = \frac{N_{\text{absorbido}}}{N_{\text{ingerido}}} \times 100 = \frac{N_{\text{ingerido}} - N_{\text{fecal}}}{N_{\text{ingerido}}} \times 100$$

$$VBP = \frac{N_{\text{retenido}}}{N_{\text{absorbido}}} \times 100 = \frac{N_{\text{ingerido}} - (N_{\text{fecal}} + N_{\text{urinario}})}{N_{\text{ingerido}} - N_{\text{fecal}}} \times 100$$

$$UPN = \frac{N_{\text{retenido}}}{N_{\text{ingerido}}} \times 100 = \frac{N_{\text{ingerido}} - (N_{\text{fecal}} + N_{\text{urinario}})}{N_{\text{ingerido}}} \times 100$$

$$PER = \frac{\Delta PC}{\text{Proteína ingerida}} = \frac{PC_{\text{final}} - PC_{\text{inicial}} \text{ (g)}}{\text{Proteína ingerida (g)}}$$

Determinación del contenido en nitrógeno de la dieta, las heces y la orina

1. En un tubo de digestión se coloca, en este orden, la muestra (1 g para la dieta y para las heces, y 1 mL para la orina), una tableta de catalizador (ó 5 g de la mezcla catalizadora) y 15 mL de H_2SO_4 (c).
2. Se digiere en la manta calefactora a 420-425 °C hasta obtener un líquido transparente. El nitrógeno de la muestra queda así convertido en $(NH_4)_2SO_4$.
3. Se deja enfriar y se añaden unos 50 mL de agua para diluir el exceso de H_2SO_4 .
4. En un Erlenmeyer se vierten 25 mL de H_3BO_3 al 4%, se añaden 3 ó 4 gotas del indicador Shiro-Tashiro, y se coloca en el aparato de destilación de Kjeldahl.
5. Se introduce el tubo con la muestra digerida en dicho aparato donde, automáticamente, se vierten 40 mL de NaOH al 40% que convierten el $(NH_4)_2SO_4$ en NH_4OH .
6. Se deja destilar hasta alcanzar en el Erlenmeyer un volumen aproximado de 100 mL. El vapor de agua originado por el aparato provoca la destilación de NH_4OH en forma de NH_3 , que se recoge en el Erlenmeyer como NH_4OH , secuestrado por el H_3BO_3 .
7. Se valora este destilado con HCl 0,1 N hasta viraje del indicador de verde a rosa-violeta.
8. La cantidad de nitrógeno contenida en la muestra se calcula teniendo en cuenta el volumen de HCl 0,1 N consumido en la valoración (V_{HCl}), la cantidad de muestra utilizada (Q), y la masa atómica del nitrógeno (14):

$$N \text{ (mg/g o mg/mL)} = \frac{V_{HCl} \text{ (mL)} \times 0,1 \text{ N} \times 14}{Q \text{ (g o mL)}}$$

BIBLIOGRAFÍA

- Boutrif E (1991). Recent developments in protein quality evaluation, en Protein quality evaluation: Report of the joint FAO/WHO Expert Consultation. FAO Food and Nutrition Paper n.º 51, Roma.
- Mataix Verdú J, Sánchez de Medina Contreras F (2009). Proteínas y aminoácidos, en "Nutrición y Alimentación Humana" (2.ª ed), pp. 119-136, J. Mataix (ed.). Ergon, Madrid.
- Millward DJ, Layman DK, Tomé D, Schaafsma G (2008). Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. *Am J Clin Nutr* 87:1576S-1581S.
- NutritionData. <http://www.nutritiondata.com> (último acceso, 28-abril-2010).
- Pérez Llamas F, Larqué Daza E, Zamora Navarro S (2010). Calidad nutritiva de los alimentos, en "Tratado de Nutrición". Tomo II, pp. 563-584, A. Gil (ed). Editorial Médica Panamericana, Madrid.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Índices químicos

	AA limitante	CQ	PDCAAS
Huevo			
Leche			
Pollo			
Merluza			
Gelatina			
Lentejas			
Nueces			
Arroz			
Pan			
Maíz			
Lentejas/arroz (4:1)			
Lentejas/arroz (1:1)			

Índices biológicos

	Dieta A	Dieta B
Contenido proteico (%)		
BN (g)		
CDP (%)		
VBP (%)		
UPN (%)		
PER (g/g)		



COMENTARIOS

A large, empty rectangular area with a light blue gradient background, intended for writing comments or answers.

Aminoácidos en alimentos destinados a población con aminoacidopatías

A. Fernández-Quintela y E. Simón Magro

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones génicas que conllevan cambios en la estructura o función de una proteína reciben el nombre de errores congénitos del metabolismo (ECM). Entre ellos, destacan los errores relacionados con el metabolismo de aminoácidos. La fenilcetonuria (PKU) es un ECM que cursa con un déficit enzimático de fenilalanina hidroxilasa. Su tratamiento dietético se fundamenta en la administración de alimentos que aporten la cantidad necesaria de fenilalanina (Phe) (Tabla P12-1), pero evitando que se produzcan efectos adversos provocados por la acumulación de metabolitos tóxicos. Los niveles de Phe adecuados en sangre no deben superar los 6 mg/dL. Asimismo, se deberá realizar un aporte adecuado de tirosina (Tyr), que no se puede obtener desde Phe (Tabla P12-2).

Por tanto, una herramienta analítica fundamental será la que nos permita conocer el perfil

de aminoácidos de un alimento o de un menú completo. Para ello, una de las técnicas principales es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Con esta información se puede establecer un tratamiento dietético personalizado que aporte el contenido mínimo necesario del aminoácido en cuestión para lograr ese equilibrio en la ingesta.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica consiste en evaluar la composición en aminoácidos de un alimento mediante una técnica analítica clásica, la cromatografía líquida en fase inversa con detección de fluorescencia, con el fin de establecer la utilidad de ese alimento para incorporarlo en el tratamiento dietético de cada aminoacidopatía.

Con los datos de Phe y Tyr obtenidos en diversos alimentos, se podrá establecer la ingesta

Tabla P12-1. CANTIDADES SUGERIDAS PARA LA PRESCRIPCIÓN DIETÉTICA DIARIA EN FENILCETONURIA (PKU) DURANTE LA INFANCIA

Edad	Ingesta		
	Proteínas (g/kg/día)	Phe (mg/kg peso corporal)	Energía (kcal/kg de peso corporal)
0-2 meses	4,2 g/kg	40-70	110
3-6 meses	3,0 g/kg	25-55	110
6-12 meses	2,5 g/kg	25-50	100
Edad	Proteínas (g/día)	Phe (mg/kg peso corporal)	Energía (kcal/día)
1-3 años	13 g/día	20-40	1.250
4-8 años	19 g/día	10-40	1.700

Tabla P12-2. INGESTA MÍNIMA RECOMANDADA DE PHE Y TYR EN PACIENTES CON PKU

Edad	Phe (mg/kg/día)	Tyr (mg/kg/día)
0-3 meses	25-70	300-350
3-6 meses	20-45	300-350
6-9 meses	15-35	250-300
9-12 meses	10-35	250-300
Edad	Phe (mg/día)	Tyr (g/día)
1-4 años	200-400	1,72-3,00
4-7 años	210-450	2,25-3,50
7-11 años	120-250	2,55-4,00
11-19 años (mujeres)	250-700	3,45-5,00
11-19 años (hombres)	225-1.200	3,38-6,50

dietética total de estos aminoácidos en un paciente PKU.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Análisis cromatográfico

El análisis de aminoácidos requiere un tratamiento previo del alimento (hidrólisis) que nos permita obtener los aminoácidos de forma libre. Para poder controlar las pérdidas o modificaciones sufridas por todos los procesos a los que son sometidos los aminoácidos presentes en el alimento, se añade un patrón interno que no aparece de forma natural en los alimentos.

A continuación, para poder conseguir una posterior detección por fluorescencia, los aminoácidos reaccionan (se derivatizan) con el reactivo *o*-ftaldialdehído (OPA) en medio alcalino y en presencia de un agente reductor, que es el 2-mercaptoetanol. Se trata de una reacción rápida que sólo la dan las aminas primarias, con lo que la prolina e hidroxiprolina, así como la cisteína, no son detectables mediante esta técnica. Los productos de esta reacción son isoindoles fluorescentes, suficientemente estables durante dos horas.

El fundamento de la separación de estos derivados reside en la diferencia de su coeficiente de reparto. La columna contiene una fase apolar, químicamente unida a unas partículas de soporte. El eluyente o fase móvil que pasa inicialmente por la

columna es muy polar. Una vez introducidos los aminoácidos derivatizados, se comienza a modificar gradualmente la mezcla del eluyente, de forma que se va haciendo más apolar. Así, la elución de los aminoácidos seguirá un orden de menor a mayor apolaridad.

Material y equipos

Equipos

- Sistema cromatográfico de alta eficacia (HPLC), que consta de:
- Bomba cuaternaria de mezcla en baja presión.
- Columna cromatográfica (fase de octadecil silano).
- Horno de columna regulado a 25 °C.
- Detector de fluorescencia calibrado a una longitud de onda de excitación de 338 nm y de emisión de 425 nm.
- Registrador-integrador de datos.
- Balanza de precisión.
- Estufa.
- Evaporador rotativo (rotavapor).
- Agitatuos.

Material

- Probeta de 100 mL.
- Vasos de precipitados.
- Sistema de filtración de fase móvil.
- Filtros de 0,45 µm de diámetro de poro.

- Micropipetas.
- Tubos Eppendorf o viales de reacción.
- Tubos de vidrio con tapón de rosca.
- Jeringa de filtración de la muestra.
- Filtros de 0,22 μm de diámetro de poro.
- Jeringa de inyección de 100 μL .
- Tablas de composición en aminoácidos de diversos alimentos.

Reactivos

- Patrones de L-aminoácidos y norleucina (patrón interno).
- Ácido clorhídrico 6 M.
- Acetonitrilo (grado HPLC).
- Metanol (grado HPLC).
- Sodio fosfato di-básico 12 hidrato.
- Sodio di-hidrógeno fosfato monohidrato.
- Ácido bórico.
- Cloruro de bario.
- Hidróxido sódico 1 M.
- *o*-Ftaldialdehído (OPA).
- 2-Mercaptoetanol.
- Agua ultrapura.
- Tampón fosfato 25 mM, pH: 6,3.
- Reactivo de derivatización.

Preparación de la fase móvil

El eluyente o fase móvil se prepara con tampón fosfato y acetonitrilo, lo cual permite variar la polaridad de la mezcla a lo largo del análisis, y en consecuencia, la elución de los aminoácidos.

El tampón fosfato 25 mM, pH 6,3 se prepara como sigue:

Se pesan 1,12 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ y se disuelven en 250 mL de agua ultrapura y 1,72 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{H}_2\text{O}$ y se disuelven en 1 litro de agua ultrapura, y se añaden 0,2 g de azida sódica.

Finalmente, se mezclan ambas disoluciones y se filtran con filtro de 0,45 μm de tamaño de poro.

Se deben preparar dos disoluciones diferentes según las siguientes proporciones:

	Eluyente A	Eluyente B
Tampón fosfato 25 mM pH: 6,3	100	1,5
Acetonitrilo	70	30

Una vez preparados los eluyentes se filtran con filtro de 0,45 μm y se desgasifican previamente al inicio del análisis.

Preparación del reactivo de derivatización

Se prepara un tampón borato 0,4 M, pH 9,5. Para ello, se pesan 2,47 g de ácido bórico y se enrasa a 100 mL con agua ultrapura. Posteriormente se ajusta el pH con NaOH 1 M.

Se pesan 56 mg de *o*-ftaldialdehído (OPA) y se disuelven en 1 mL de metanol. Posteriormente se añaden 9 mL de tampón borato 0,4M, pH 9,5. A esta mezcla se le añaden 40 μL de 2-mercaptoetanol. Esta disolución se debe guardar a 4 °C. Cada 3 días se debe regenerar añadiendo 20 μL de 2-mercaptoetanol, aunque conviene desecharla en el plazo de una semana.

Protocolo

Análisis cromatográfico

Obtención del hidrolizado de aminoácidos

En un tubo de vidrio, se pesa 0,1 g de muestra y se añaden 3 mg del patrón interno (norleucina). Se añaden 10 mL de HCl 6 M, se cierran bien los tubos en atmósfera de nitrógeno, y se somete a hidrólisis la suspensión durante 22 horas a 110 °C en una estufa. Para la determinación del triptófano, la hidrólisis se realiza con BaCl_2 , ya que se degrada totalmente con la hidrólisis ácida.

El hidrolizado en el que se encuentran los aminoácidos libres se concentra en un rotavapor hasta sequedad, y se recupera con 30 mL de agua ultrapura.

Se filtra con filtros de 0,45 μm de diámetro de poro, y se procede a su derivatización para el análisis.

Procedimiento de derivatización

Se toman 250 μL del hidrolizado y se mezclan en un tubo Eppendorf con el mismo volumen de la disolución de trabajo de OPA. Una vez mezclado se agita vigorosamente en un agitator durante 15 s y se mantiene en reposo 1 min. Posteriormente, se filtra la muestra con filtros de 0,22 μm de tamaño de poro, y se inyectan 20 μL en el cromatógrafo.

Establecimiento de las condiciones de análisis

En cada equipo analítico se deben establecer las condiciones óptimas para el análisis cromatográfico, debido a la gran cantidad de variables que confluyen en esta técnica, que deben ser obtenidas de forma experimental. No obstante, a continuación se enumera una combinación de parámetros que puede servir de ejemplo.

- Flujo de la fase móvil: 0,9 mL/min
- Temperatura de la columna: 25 °C
- Sensibilidad del detector: 60%
- Programa de gradiente:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	90	10
25	48	52
27	35	65
45	30	70
50	30	70
65	20	80
70	10	90

Antes de dar comienzo al análisis se mantiene durante 10-15 min la composición inicial de la fase móvil, con el fin de acondicionar la columna. Inmediatamente después de inyectar la muestra en el cromatógrafo, se procede a desarrollar el programa de gradiente descrito. Así, se consigue la separación cromatográfica de los aminoácidos, respondiendo a los diferentes equilibrios de polaridad-apolaridad, que se producen al modificarse la composición de la mezcla. Una vez finalizado el análisis, se lava la columna con agua:acetonitrilo (35:65) y se prepara el sistema para la siguiente muestra.

Tratamiento dietético de la fenilcetonuria

Una vez calculada la composición en aminoácidos de los alimentos habituales en la dieta de un paciente PKU, se debe establecer un tratamiento dietético dirigido a mantener un equilibrio entre la ingesta de Phe y las necesidades nutritivas de ese aminoácido esencial en el individuo.

Teniendo en cuenta las recomendaciones establecidas en las tablas P12-1 y P12-2, y la tabla de composición en proteínas y aminoácidos de alimentos (Tabla P12-3), se debe preparar una dieta adaptada a las necesidades de un paciente PKU de edad escolar.

Cálculos**Análisis cromatográfico**

Previamente, se han de calcular los valores correspondientes a la repetibilidad y reproducibilidad del método cuantitativo, así como la linealidad de respuesta, precisión y exactitud, y los límites de cuantificación de nuestra técnica cuantitativa. Las definiciones de estos términos, así como la forma de obtenerlos, las podemos encontrar en cualquier monografía dedicada a la validación de técnicas analíticas.

La cuantificación de los aminoácidos se realiza por el método del patrón interno. Esta técnica permite corregir las pérdidas debidas a la manipulación de la muestra o a fallos en la inyección.

Cada aminoácido, incluido el patrón interno, posee un factor de respuesta (F_{RAA}) que relaciona la concentración del aminoácido (AA) con la señal (área bajo la curva) que provoca ese mismo aminoácido en el cromatógrafo.

$$F_{RAA} = \frac{\text{Concentración AA}}{\text{Area AA}}$$

La señal obtenida para el patrón interno (PI), en nuestro caso la norleucina, la emplearemos para establecer una relación entre el factor de respuesta de cada aminoácido individual con respecto al de este patrón interno, denominado factor de respuesta respecto al patrón interno (F_{RPI}).

El valor de este F_{RPI} debe ser lo más cercano a la unidad posible. Para ello, el patrón interno elegido debe tener una molécula estructuralmente similar desde el punto de vista químico, así como un comportamiento físico-químico durante todo el análisis semejante al de la molécula que vayamos a analizar.

Por tanto, mediante este método del patrón interno, podremos calcular las concentraciones para cada aminoácido individual aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración AA (mg/100 g muestra)} = F_{RPI} \times \frac{\text{Concentración PI (mg/100 g muestra)} \times \text{Área AA}}{\text{Área PI}}$$

Tabla P12-3. CONTENIDO EN PROTEÍNAS, FENILALANINA Y TIROSINA DE ALGUNOS ALIMENTOS PERTENECIENTES A LOS DIFERENTES GRUPOS ALIMENTARIOS

Alimento	Contenido por cada 100 g de porción comestible			Alimento	Contenido por cada 100 g de porción comestible		
	Proteína (g)	Phe (mg)	Tyr (mg)		Proteína (g)	Phe (mg)	Tyr (mg)
Leche de vaca entera	3,5	167	168	Almendra	20	1.146	—
<i>Petit suisse</i> natural	2,8	425	425	Cacahuete	23	1.539	—
Queso de bola	29	1.450	1.475	Nuez	15	766	446
Cuajada	4,5	239	217	Castaña	4	192	128
Yogurt natural con fruta	3	154	142	Uva	1	12	10
Salchicha fresca	13	655	566	Piña	0,5	13	13
Pavo	31,9	1.100	1.066	Naranja	1,1	30	17
Foie-gras	7	589	460	Plátano	1,4	34	21
Jamón york	20,9	789	607	Garbanzos	18	502	220
Tocino blanco fresco	1,9	77	52	Lentejas	24	445	241
Salchichón	18,5	948	754	Huevo entero	13	686	506
Arroz blanco	7,6	100	—	Anchoas	20	1.130	975
Pasta dura (macarrones, etc.)	12,8	260	—	Pulpo	10,6	534	476
Pan molde blanco	7,8	432	293	Salmón	16	832	672
Harina de Tempura	9,4	465	254	Chocolate negro	6,2	235	95
<i>Corn flakes</i>	6,3	355	166	Chocolate a la taza	3,5	189	90
Avena	14	141	92	Puerros	2	63	38
Galletas vainilla	3,8	162	103	Lechuga	1,2	54	34
Donut	6,2	382	184	Patata, cocida	2	100	80
Papilla de cereales sin gluten	5,4	299	205	Champiñón, setas	2,4	74	66
Magdalena	6,4	420	—	Zanahoria	1,2	13	31
Patatas fritas, <i>chips</i>	6,7	250	270	Tomate frito	1,7	49	114

BIBLIOGRAFÍA

Asociación de fenilcetonúricos y OTM de Euskadi. <http://www.cuskadipkuotm.org> (último acceso: 25-abril-2010).

Bueno M, Sarría A, Pérez González JM (2007). Nutrición en Pediatría (3.ª ed). Ergon, Madrid.

Hanczkó R, Jámora A, Perl A, Molnár-Perl I (2007). Advances in the *o*-phthalaldehyde derivatizations:

Comeback to the *o*-phthalaldehyde-ethanethiol reagent. *J Chromatogr A* 1163:25-42.

Molnár-Perl I (1999). Advances in the analysis of tryptophan and its related compounds by chromatography. *Adv Exp Med Biol* 467:801-816.

Tabla de composición de alimentos (2004). Novartis, Barcelona.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Análisis cromatográfico

Los resultados procedentes del análisis cromatográfico de los alimentos se presentan siguiendo el siguiente esquema:

Alimento	Patrón interno			Aminoácido ₁ (AA ₁)			Aminoácido ₂ (AA ₂)		
	mg/100 g muestra	Área PI	F _R	Área AA ₁	F _{pp1} AA ₁	mg/100 g muestra	Área AA ₂	F _{pp1} AA ₂	mg/100 g muestra

Tratamiento de fenilcetonuria

Preparar la cena de un niño PKU de nueve años, sabiendo que pesa 30 kilos y que, ingiriendo una cantidad de 30 mg de Phe/kg de peso corporal/día, consigue mantener una fenilalaninemia por debajo de 6 mg/dL. *Datos:* Ingesta total de Phe realizada hoy sumando desayuno, almuerzo, comida y merienda: 550 mg.

Datos personales		Edad	Sexo	Peso corporal (kg)
Ingesta recomendada de Phe (mg/día)				
Alimento		Contenido en nutrientes		
Descripción	Peso (g)	Proteína (g)	Phe (mg)	Tyr (mg)
Suma total ingestas				
¿Cumple recomendación?				



COMENTARIOS

Alcoholemia como índice de consumo

M. I. Torres Villanueva, D. Ansorena Artieda e I. Astiasarán Anchia

INTRODUCCIÓN

El alcohol es un compuesto de gran interés, tanto desde el punto de vista de su aporte energético a la dieta, como desde su incidencia en la seguridad, por los trastornos agudos que puede provocar en el consumidor, así como por sus efectos tóxicos a medio y largo plazo, al actuar como un tóxico alimentario.

La actual legislación sobre etiquetado de los productos alimenticios señala la necesidad de tener en cuenta la concentración de alcohol de un alimento (por ejemplo, una bebida alcohólica) al determinar su valor energético. El factor de conversión para obtener su aporte energético es de 7 kcal por gramo de alcohol (RD 930/1992).

El consumo excesivo de alcohol afecta al sistema cardiovascular, puede provocar aumento de la actividad cardíaca, inflamación de fibras musculares, vasodilatación periférica y elevación de la presión sanguínea. Sin embargo, hay también trabajos que señalan que pequeñas cantidades de alcohol pueden tener efectos beneficiosos en la prevención de la aterosclerosis y de las enfermedades cardíacas, fundamentalmente por ayudar a incrementar los niveles de HDL-colesterol e inhibir la formación de trombos (Kawano, 2010). Son también conocidos los efectos negativos del alcohol a nivel del sistema digestivo, esófago, estómago, hígado y páncreas, estando muchas veces relacionado con el desarrollo de cánceres en dichos órganos.

El alcohol altera, de forma directa y más o menos inmediata, la acción de los neurotransmisores produciendo múltiples efectos como retardo de los reflejos, disminución de la alerta, de la capacidad de concentración y las funciones motoras,

cambios en la visión, pérdida de coordinación muscular, temblores y alucinaciones. Los efectos del alcohol a nivel del cerebro y sistema nervioso tienen una gran repercusión no sólo sobre el individuo sino también a nivel social.

Uno de los efectos más significativos es en la conducción, motivo por el cual existen condiciones legales para el consumo de alcohol si se va a conducir. Estas condiciones se controlan mediante los límites legales establecidos para las concentraciones de alcohol en aire espirado (aliento) y/o sangre. En España, actualmente la ley establece el límite superior de la tasa de alcoholemia en 0,25 miligramos por litro en aire espirado o 0,5 g por litro en sangre; excepto en los casos de conductores con menos de 2 años de carnet o los profesionales (camioneros y conductores de autobuses), en que la cifra es de 0,3 g/L del alcohol en sangre, que equivale a 0,15 mg/L en aire (RD 2282/1998).

Métodos para medir los niveles de alcohol en sangre

Las posibilidades de determinar la concentración de alcohol en sangre son muy diversas. A nivel clínico, para hacer un seguimiento del consumo de alcohol en pacientes, se utilizan biomarcadores, como los derivados de fosfatidiletanol, medidos en sangre a través de técnicas de cromatografía líquida (LC-MS) (Helander & Zheng, 2009).

En el otro extremo, se encuentran las técnicas rápidas utilizadas para la determinación de la tasa de alcoholemia en los conductores. Para estas medidas se emplean alcoholímetros capaces de determinar el nivel de alcohol en el aire espirado gracias a un sensor de gas. La concentración de

alcohol en aire (mg/L de aire) se extrapola a g/L de sangre multiplicando por el factor de conversión de 2 (Jones & Andersson, 2003).

A nivel de laboratorio convencional y forense, las técnicas más usuales son las de cromatografía gaseosa (Jones & Schuberth, 1989; Jones, 2008), con inyección directa de muestras o previa extracción mediante sistemas de espacio de cabeza. Se puede aplicar a la determinación de alcohol tanto en muestras biológicas (sangre) como en bebidas alcohólicas. Para la cuantificación se emplea isopropanol como patrón interno.

OBJETIVO

La práctica trata de determinar, de forma sencilla, la concentración de etanol en sangre para poder establecer su adecuación con la legislación vigente respecto a los límites establecidos para una conducción segura.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Se describen dos métodos, el método de Widmark, basado en un método químico sencillo que se fundamenta en la oxidación del etanol por acción del dicromato potásico en medio sulfúrico y posterior valoración del exceso de dicromato con tiosulfato sódico. Si se compara esta técnica con la cromatográfica, los resultados, aunque menos exactos, no difieren significativamente.

Material y reactivos

Método químico (de Widmark)

Material

- Manta calefactora.
- 2 matraces de fondo redondo para muestra y blanco (matraz de Widmark de 50 mL).
- Columna de rectificación.
- Tubo acodado para empalmar la columna con el refrigerante.
- Refrigerante.
- Colector.

- 2 matraces aforados de 100 mL para recoger el destilado (muestra y blanco).
- 2 matraces Erlenmeyers.
- Bureta y pipetas.

Reactivos

- Solución saturada de ácido pícrico.
- Solución de dicromato potásico (recristalizado) 0,25 N. Disolver 12.250 g de $K_2Cr_2O_7$ en agua desionizada y llevar hasta enrase a 1 litro.
- Ácido sulfúrico concentrado (densidad 1,84).
- Solución de yoduro potásico al 1%.
- Solución de ácido sulfúrico al 10%: disolver 5,66 mL de sulfúrico concentrado (96%) en agua desionizada y llevar a enrase hasta 100 mL.
- Bicarbonato sódico para análisis.
- Solución de tiosulfato sódico 0,01 N. Preparar una disolución 0,1 N de tiosulfato pesando 2,482 g de $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ y llevarlo a 100 mL. Diluir 10 mL de $Na_2S_2O_3$ 0,1 N y llevar hasta 100 mL con agua desionizada. Valorar esta disolución con la solución de dicromato potásico para determinar su normalidad exacta.
- Indicador de engrudo de almidón: pesar 2,5 g de almidón soluble en polvo junto con 10 mg de yoduro mercúrico. Llevar a un vaso y añadir un volumen de agua suficiente para poder hervir la suspensión con fluidez. Llevar después ésta a un matraz de 1 litro y enrasar con agua destilada. Pasarlo a un vaso y mantenerlo en ebullición durante 10 minutos. El líquido obtenido debe estar limpio; si es necesario, se filtra.
- Mezcla crómica: disolver 50 g de $K_2Cr_2O_7$ en 500 mL de agua destilada. Añadir con mucho cuidado (dentro de una campana y en un baño de hielo) 500 mL de ácido sulfúrico concentrado. Agitar y dejar enfriar.

Importante: Todo el material del equipo de destilación debe ser lavado con mezcla crómica y enjuagado con abundante agua destilada antes de su uso. Una vez montado se destilan unos 30 mL de agua desionizada para arrastrar cualquier posible traza de oxidantes.

Método cromatográfico

Material

- Cromatógrafo de gases (Perkin Elmer 8310).

- Columna: Porapak Q 80/100, 2 m × 1,8" con precolumna.
- Detector: FID.
- Condiciones:
 - Temperatura inyector 240 °C.
 - Temperatura horno 190 °C.
 - Temperatura detector 240 °C.
 - Flujo hidrógeno 30 mL/minuto.
 - Flujo aire 200 mL/minuto.
 - Flujo portador 20 mL/minuto.
- Membrana de ultrafiltración de 0,45 nm (ACRODISC®).

Reactivos

- Solución de isopropanol (aproximadamente 2,3 g/L): se pesa una cantidad aproximada de 0,23 g, anotando el peso exacto. Se diluye con agua desionizada hasta 100 mL.
- Solución de etanol (aproximadamente 2,0 g/L): se pesan aproximadamente 0,2 g, anotando el peso exacto. Se diluye con agua desionizada hasta 100 mL.

Protocolo

Método de Widmark

Se toman 5 mL de la sangre a analizar, se añaden 12,5 mL de solución saturada de ácido pícrico y 20 mL de agua destilada, lavando bien la boca del matraz. Se añaden 3 o 4 perlas de vidrio y se destila a reflujo (Fig. P13-1) hasta un volumen de 20 mL, medidos por referencia comparando con otro matraz que contenga ese volumen de agua desionizada y que constituirá el ensayo en blanco.

Una vez destilado, a ambos matraces se añaden 20 mL de dicromato potásico 0,25 N (recristalizado) y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, tapándolos a continuación y agitando. Se llevan a baño María y se tienen en ebullición 10 minutos. Se dejan enfriar y se completa hasta 100 mL con agua destilada. Agitar.

Se toman 2 mL de cada matraz y se ponen en dos tubos Erlenmeyers añadiéndoles a cada uno 5 mL de solución KI al 1%, 10 mL de ácido sulfúrico al 10% y 0,1 g de bicarbonato sódico. Se dejan 5 minutos en reposo y en la oscuridad.

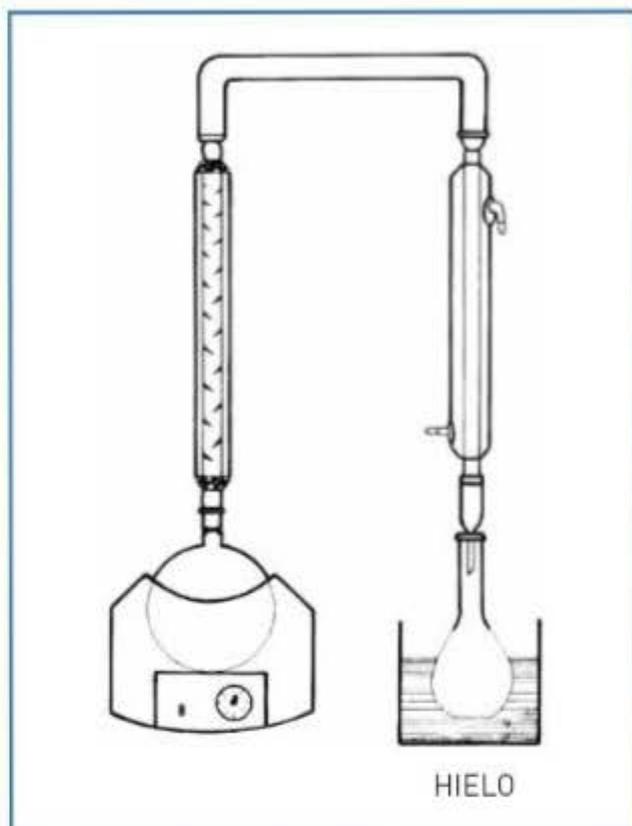


Figura P13-1. Montaje para técnica de alcoholemia

A continuación se valoran con tiosulfato sódico 0,01 N, empleando como indicador engrudo de almidón.

Método cromatográfico

Previamente a la determinación, se realiza la comprobación de la linealidad: comprobar la linealidad de la respuesta del FID en las condiciones descritas para el etanol (de 0 a 5,3 µg).

Preparación del patrón de calibración:

- 1 mL de la solución patrón de etanol.
- 1 mL de la solución patrón de isopropanol.
- 4 mL de agua desionizada.

Se inyecta 1 µL de patrón y se desarrolla el cromatograma. Se realiza la calibración por el método del patrón interno. Se realizan al menos dos inyecciones más para comprobar la calidad de la calibración y obtener el factor de respuesta promediado para varias inyecciones.

Preparación de la muestra (sangre):

- 1 mL de muestra.
- 1 mL de solución patrón de isopropanol.
- 4 mL de agua desionizada.

Se agita y se filtran unas gotas a través de 0,45 µm.

Se inyecta 1 µL de filtrado. Se repite hasta que tres resultados sean coincidentes.

Cálculos

Método de Widmark

A = mL de tiosulfato gastados en el ensayo en blanco.

B = mL de tiosulfato consumidos por la muestra problema.

Peso equivalente del etanol = 46/4 = 11,5.

N del tiosulfato = 0,01 (o el valor corregido mediante valoración con dicromato).

Etanol (g/L de sangre) = 11,5 × N × (A - B) × 10

Método cromatográfico

El factor de respuesta (FR) lo proporciona el propio cromatógrafo o bien se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$FR = (C \text{ etanol} / C \text{ isopropanol}) / (A \text{ etanol} / A \text{ isopropanol})$$

Donde:

- C etanol: concentración de etanol en la solución patrón (g/L).

- C isopropanol: concentración de isopropanol en la solución patrón (g/L).
- A etanol: área de pico del etanol.
- A isopropanol: área de pico del isopropanol.

La concentración del etanol en la muestra inyectada la proporciona el propio cromatógrafo, o se puede obtener a partir de la siguiente fórmula:

$$C \text{ etanol} = FR (A \text{ etanol} / A \text{ isopropanol}) \times C \text{ isopropanol}$$

BIBLIOGRAFÍA

- Garrido-Lestache Cabrera, R (1980). Método Widmark para determinación de etanol en sangre. En "Emergencias toxicológicas médico-farmacéuticas" (2.ª parte). Técnicas Analíticas.
- Jones, AW (2008). Ultra-rapid rate of ethanol elimination from blood in drunken drivers with extremely high blood-alcohol concentrations. *Int. J. Legal Med* 122:129-134.
- Kawano, Y (2010). Physio-pathological effects of alcohol on the cardiovascular system: its role in hypertension and cardiovascular disease. *Hypertension Research* 33:181-191.
- Leander, A, Zheng, Y (2009). Molecular species of the alcohol biomarker Phosphatidylethanol in human blood measured by LC-MS. *Clinical Chemistry* 55:7,1395-1405.
- Real Decreto 2282/1998, de 23 de octubre, por el que se modifican los artículos 20 y 23 del Reglamento General de Circulación, aprobado por RD 13/1992, de 17 de enero. BOE núm. 26, de 6 de noviembre de 1998.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



	Resultados obtenidos (g etanol/L sangre)	
	Métodos de Widmark	Método cromatográfico
Muestra de sangre de una persona que no haya consumido alcohol		
Muestra de sangre de una persona que haya consumido alcohol		



COMENTARIOS

Efecto de la ingesta de agua y minerales en la regulación del equilibrio hidroelectrolítico

M. T. Macarulla Arenaza y M. P. Portillo Baquedano

INTRODUCCIÓN

El agua es un nutriente con funciones estructurales y reguladoras vitales, por lo que se considera el más esencial de todos los nutrientes. Un balance hídrico inadecuado, ya sea por defecto (deshidratación) o por exceso (hiperhidratación), origina graves alteraciones en la salud. Además, tanto la composición iónica como la osmolaridad y el pH de los diferentes compartimentos acuosos corporales deben permanecer siempre dentro de unos márgenes muy estrechos. El volumen y la composición de los líquidos corporales dependen de tres factores muy variables: la ingesta (alimentos sólidos y líquidos), la producción endógena de agua (originada por la combustión metabólica de los nutrientes energéticos) y la eliminación (orina, sudor, heces, etc.). Por tanto, el organismo necesita sistemas homeostáticos que preserven el equilibrio hidroelectrolítico.

El principal regulador es el sistema renal, que dispone de mecanismos específicos de filtración glomerular y de reabsorción y secreción tubulares, regulados a su vez por la hormona antidiurética (ADH, por *Antidiuretic Hormone*), el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS, por *Renin-Angiotensin-Aldosterone System*) y el péptido natriurético auricular o atrial (ANP, por *Atrial Natriuretic Peptide*). Así, mientras que la ADH y el RAAS disminuyen la eliminación de orina, la primera por aumento de la reabsorción de agua y la segunda por aumento de la reabsorción de Na^+ , Cl^- y agua, el ANP incrementa la eliminación de orina mediante la inhibición de los dos anteriores y por efecto directo a través del aumento de la eliminación de Na^+ . Además, el RAAS también interviene en la regulación del pH del medio

interno, puesto que ante cualquier situación que lo disminuya demasiado (acidosis) se estimula la secreción de aldosterona, que incrementa la eliminación renal de H^+ (en forma de H_2PO_4^- y NH_4^+), la reabsorción del HCO_3^- filtrado y la formación de más HCO_3^- a partir de CO_2 gracias a su anhidrasa carbónica. El riñón también es capaz de evitar que el pH del medio interno sea demasiado elevado (alcalosis) aumentando la excreción urinaria de HCO_3^- y disminuyendo la de H^+ .

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica consiste en estudiar la función renal reguladora del equilibrio hidroelectrolítico a través de la modificación del volumen y de la composición de la orina.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Con el fin de analizar la regulación del equilibrio hidroelectrolítico realizada por los riñones, se somete a animales de experimentación a sobrecargas de agua y diferentes electrolitos, y posteriormente se valora el volumen, la densidad, el pH y los cloruros de la orina que eliminan.

Material y equipos

Material biológico

- Ratas de 200-250 g.

Equipos

- Jaulas de metabolismo.
- Baño termostático.
- Balanza.
- Densitómetro.

Material

- Pipetas de 1 mL, 5 mL y Pasteur.
- Embudos.
- Vasos de precipitados.
- Probetas graduadas de 10 mL.
- Jeringas y sondas orogástricas.
- Tubos de ensayo y gradilla.
- Papel indicador de pH.

Reactivos

- NaCl 0,15 M.
- NaCl 0,85 M.
- NaHCO₃ 0,15 M.
- NH₄OH 0,15 M.
- K₂CrO₄ 1 M.
- AgNO₃ 0,05 N.

Protocolo

1. Se pesan las ratas, se distribuyen homogéneamente en seis grupos (I-VI), y se les mantiene en ayunas una noche. El grupo I se emplea como control, por lo que estos animales no sufren ninguna manipulación. A los animales del grupo II se les administra por vía oral una sobrecarga de agua (4 mL/100 g de peso corporal). Los animales de los restantes grupos reciben por la misma vía un volumen similar de las distintas disoluciones salinas: NaCl 0,15 M los del grupo III, NaCl 0,85 M los del grupo IV, NaHCO₃ 0,15 M los del grupo V y NH₄OH 0,15 M los del grupo VI. Se introducen los animales en las jaulas de metabolismo y se recogen sus orinas cada media hora.

2. De cada muestra de orina se valora:

- Volumen.
- Densidad: normalmente se mide con un densitómetro, pero si la muestra es demasiado pequeña se puede medir por pesada de un volumen concreto.
- pH.
- Cloruro: en un tubo de ensayo se vierten 0,5 mL de orina y se añade una gota de la disolución de K₂CrO₄ 1 M, que actúa como indicador. A continuación, se adiciona en caliente (a unos 50 °C), gota a gota y agitando continuamente, AgNO₃ 0,05 N hasta que la disolución vire de color amarillo claro a pardo-anaranjado.

Cálculos

La cantidad de cloruro de cada muestra de orina se calcula a partir del volumen de AgNO₃ consumido (V) y el volumen de la muestra (V_m):

$$[\text{Cl}^-] \text{ (meq/mL o eq/L)} = (0,05 \text{ N} \times V) / V_m$$

BIBLIOGRAFÍA

- Caramelo C, Hernández J, Carbonell Di Mola JA (2005). Regulación del volumen y la osmolaridad de los líquidos corporales. Mecanismos de concentración y dilución de la orina, en "Fisiología Humana", pp. 402-413, J.A.F. Tresguerres (ed.). McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- López Novoa JM (2010). Metabolismo hidromineral: agua y electrolitos, en "Tratado de Nutrición", tomo I, pp. 593-621, A. Gil (ed.). Editorial Médica Panamericana, Madrid.
- Macarulla MT, Portillo MP (2008). Utilización del agua y regulación del equilibrio hidro-electrolítico, en "Bases de la Alimentación Humana", pp. 327-342, V.M. Rodríguez y E. Simón (eds.). Netbiblo, La Coruña.
- Mataix J, García L (2009). Agua y equilibrio hidroelectrolítico, en "Nutrición y Alimentación Humana" (2.ª ed.), pp. 927-950, J. Mataix (ed.). Ergon, Madrid.
- Patel S (2009). Sodium balance-an integrated physiological model and novel approach. Saudi J Kidney Dis Transpl 20:560-569.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

	Medidas	Volumen (mL)	Densidad (g/mL)	pH	Cloruro (eq/L)
Grupo I (Control)	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
Grupo II (Agua)	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
Grupo III (NaCl 0,15 M)	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
Grupo IV (NaCl 0,85 M)	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
Grupo V (NaHCO ₃ 0,15 M)	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
Grupo VI (NH ₂ OH 0,15 M)	1				
	2				
	3				
	4				
	5				



COMENTARIOS

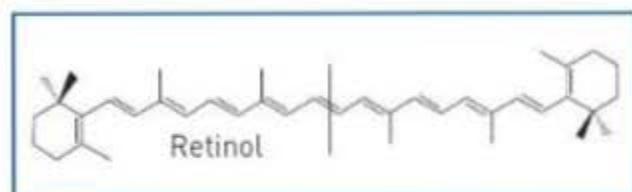
A large, empty rectangular area with a light blue gradient background, intended for users to write their comments or notes.

Utilización nutritiva de β -carotenos

S. Navas-Carretero y J. I. Monreal Marquiegui

INTRODUCCIÓN

El β -caroteno es un constituyente habitual de vegetales y frutas. Por el carácter hidrofóbico de su estructura se presenta asociado a grasas, de las que se libera en el tracto gastrointestinal, por la acción digestiva de hidrolasas pancreáticas, en la emulsión propiciada por las sales biliares. Se absorbe asociado a lípidos y se transporta en sangre unido a lipoproteínas. La hidrólisis de la cadena poliénica da lugar a la vitamina A, que puede formar ésteres con ácidos grasos de cadena larga y constituir derivados que llegan a superar el 50% de los carotenoides presentes en sangre.



El β -caroteno se encuentra en la mayor parte de los vegetales, incluidos los verdes, de modo que personas de hábito alimentario vegetariano estricto y las que ingieren, por ejemplo, gran cantidad de zanahorias o lechuga presentan niveles de carotenos circulantes más elevados que las de dieta variada. En la situación extrema de hipercarotenemia, la piel y mucosas pueden colorearse con un tono naranja.

Además del ámbito puramente nutricional, la determinación sanguínea de carotenos se ha aplicado al estudio de cuadros de maldigestión y/o mala absorción de grasas por el carácter lipófilo de la molécula. En la insuficiencia hepática, especialmente en la mala función biliar, y en el fallo pancreático exocrino prolongado, disminuye la

capacidad digestiva y absorbiva, lo que tiene su reflejo en la disminución plasmática de los carotenoides.

Otro aspecto adicional de la disponibilidad tisular de β -caroteno y vitamina A es su posible acción preventiva de algunas enfermedades neoplásicas que afectan especialmente a epitelios (pulmón, tracto urinario, piel). El origen de este efecto podría estar en su actividad antioxidante, que convierte a los carotenos en eficaces inhibidores de los radicales libres derivados del oxígeno. Forman parte también de este sistema defensivo las vitaminas C y E, aminoácidos con grupo sulfidrilo, selenio (presente en la metaloenzima glutatión peroxidasa) y otros elementos traza.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica consiste en determinar los niveles plasmáticos de carotenoides.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

En ausencia de alguna patología digestiva, los niveles plasmáticos de carotenoides reflejan el tipo de dieta seguida por el individuo. Para poder determinar los niveles plasmáticos lo primero que se debe hacer es liberar los carotenoides de las proteínas, mediante la adición de etanol al suero. Una vez los carotenoides libres, se extraen con éter de petróleo, el cual adquirirá un color amarillo naranja, cuya absorbancia a 450 nm proporcionará datos de la concentración de carotenoides.

Material y equipos

Muestras biológicas

- Se empleará suero humano, obtenido a partir de sangre total centrifugada a 1.500 g durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente.

Equipos

- Centrifuga.
- Espectrofotómetro.

Material

- Tubos vacutainer para la obtención de suero (con gel activador).
- Tubos de centrifuga con cierre hermético.
- Pipetas de cristal.
- Matraces aforados de 100 mL.
- Cubetas para el espectrofotómetro.

Reactivos

- Etanol absoluto.
- Éter de petróleo.
- Solución de β -caroteno con concentración de 1 mg/dL en éter de petróleo. Debe estar conservada fuera de la luz, en atmósfera inerte o congelada.

Protocolo

1. Se dispondrá de al menos 3 mL de suero de 10 voluntarios, 5 de los cuales habrán seguido durante los días previos a la extracción de sangre una dieta rica en carotenos y 5 que habrán seguido una dieta baja en carotenos.
2. A partir de la solución de β -caroteno de 1 mg/dL se obtendrán tres patrones con diluciones de 50, 100 y 150 μ g/dL. Para ello, se pipetearán 5, 10 y 15 mL de la solución madre de β -caroteno y se enrasarán, con éter de petróleo hasta 100 mL en los matraces aforados.

3. De cada voluntario se cogerán 3 mL de suero, los cuales se dispondrán en los tubos de centrifuga para añadir a continuación, gota a gota, 3 mL de etanol, agitando suavemente los tubos durante la adición, para facilitar la mezcla del etanol con el suero.
4. Una vez añadido el etanol se añadirán 6 mL de éter de petróleo, se tapan los tubos con el cierre hermético y se agitarán durante 10 minutos. Posteriormente se deberán centrifugar los tubos durante cinco minutos a 2.000-2.500 g.
5. Se recogerán los sobrenadantes en cubetas para espectrofotometría y se leerán las absorbancias a 450 nm frente a un blanco de éter de petróleo, de los patrones y de las muestras.

Cálculos

Con los datos de absorbancia de los tres patrones se elaborará una recta patrón mediante regresión lineal, y se obtendrán las concentraciones de las muestras problema, teniendo en cuenta que se han diluido las muestras problema a la mitad por la adición del etanol (multiplicar por factor de dilución =2).

De cara a la interpretación de los resultados obtenidos, se debe tener en cuenta que en personas con una alimentación variada, los niveles séricos de carotenoides se sitúan entre 50 y 250 μ g/dL. En individuos con una alimentación vegetariana, estos niveles pueden elevarse hasta los 500 μ g/dL, mientras que en casos de dietas bajas en carotenos, los resultados serán inferiores a los de referencia, sin que ello por sí mismo indique la existencia de alguna patología.

BIBLIOGRAFÍA

- Cohen RD, Lewis B, Alberti KGMM, Denman AM (1990). The metabolic and molecular basis of acquired disease. Ballière Tindall, Londres.
- Henry JB (1988). Todd-Sanford-Davidsohn: Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. Salvat, Barcelona.
- Pesce AJ, Kaplan L (1990). Química Clínica. Métodos. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.

**PRESENTACIÓN DE RESULTADOS**

	Concentración de carotenos		
	n (n.º muestras)	Media	Desviación estándar
Individuos con alta ingesta de carotenos			
Individuos con baja ingesta de carotenos			
Comparación de medias (t de student)	t p		

**COMENTARIOS**

Utilización nutritiva de la vitamina C en función de las necesidades fisiológicas

D. García-Díaz y J. A. Martínez Hernández

INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento en 1920, probablemente ninguna otra sustancia química ha sido tan celebrada como la vitamina C (ácido ascórbico). Es una de las vitaminas de tipo hidrosoluble que se caracteriza por una composición similar a la de un monosacárido de seis carbonos. La mayoría de las especies de mamíferos sintetizan ácido ascórbico *de novo*, pero los cerdos de guinea, los primates y los seres humanos dependen absolutamente del abastecimiento externo. Se necesita en grandes cantidades, pues no es retenida por el organismo y el exceso es inmediatamente excretado por la orina. Los efectos benéficos de la vitamina C son universalmente reconocidos: ayudante en la curación de heridas, colaboración en la absorción de hierro, cofactor en la biosíntesis de colágeno, carnitina, catecolaminas y neurohormonas peptídicas, funciones antioxidantes y participación en la respuesta inmune.

Las pruebas de laboratorio destinadas a relacionar la ingesta de vitamina C y su utilización nutritiva incluyen determinaciones de los niveles de ácido ascórbico en hematograma completo, en plasma, eritrocitos y leucocitos, así como en la eliminación a través de la orina, entre otros. En una persona bien alimentada, son excretados entre 20-50 g de ácido ascórbico por la orina si sus tejidos no se encuentran saturados. Luego de que una persona sana ingiera una megadosis de vitamina C (250-500 mg), sus tejidos son fácilmente saturados y un exceso debería excretarse por la orina tras 3 a 4 horas.

OBJETIVO

Detectar la eliminación urinaria de ácido ascórbico tras la ingesta de una dosis oral previa para poder detectar posibles deficiencias (retención) de esta vitamina.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

El 2,6-dicloro-indofenol es un compuesto indicador de oxidación-reducción, que se presenta azul en pH básico y rosa en pH ácido. La reducción de este compuesto indicador, debido a la oxidación del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico, lleva a un cambio de color que puede ser medido en un espectrofotómetro a una determinada longitud de onda. Con el uso de una recta patrón, la concentración de vitamina C de la muestra problema puede ser determinada. El ácido acético se utiliza para mantener la acidez apropiada en la reacción y así evitar la autooxidación del ácido ascórbico a alto pH.

Material y reactivos

Equipos

- Espectrofotómetro.

Material

- Tubos de ensayo.
- Pipetas.

Reactivos

- Solución 12 mg/L de 2-6 diclorofenol-indofenol.
- Vitamina C (ácido ascórbico).
- Ácido acético al 5%.

Protocolo

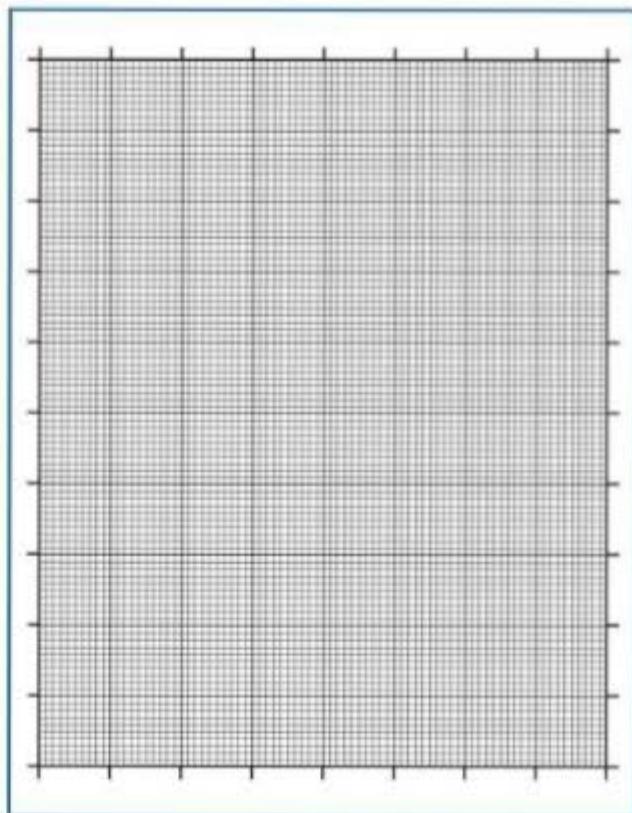
El sujeto en el que va a valorarse la posible carencia vitamínica recibe en ayunas 10 mg de ácido ascórbico/kg peso corporal. La orina de las 6 horas siguientes se recoge, se mide y se diluye 1:10 con ácido acético al 5%. Posteriormente se añaden 9 mL de la solución preparada de 2-6 diclorofenol-indofenol, se agita y se lee la absorbancia con un espectrofotómetro a 520 nm de longitud de onda, previamente calibrado con agua destilada. La concentración de ácido ascórbico se interpola a partir de una curva patrón que se realiza previamente con soluciones de ácido ascórbico a diferente concentración, señaladas en la Tabla P16-1. Si la absorbancia de la muestra problema es muy alta, se diluye la orina con ácido acético al 5% (1:10; 1:100, etc.) hasta que el valor de absorbancia se encuentre en el rango de los patrones. Se considera la dilución que se ha hecho para luego multiplicar el resultado por este factor y así obtener el valor de concentración real en la muestra.

Cálculos

El cálculo de la eliminación urinaria de la carga oral de ácido ascórbico se realiza con una

Tabla P16-1. VOLÚMENES DE REACTIVOS PARA LA REALIZACIÓN DEL ENSAYO

	Muestra	Agua	2,6-dicloro-indofenol
Blanco	-	10 mL	-
Patrón I (1,5 mg/mL)	1 mL	-	9 mL
Patrón II (3 mg/mL)	1 mL	-	9 mL
Patrón III (6 mg/mL)	1 mL	-	9 mL
Problema	1 mL	-	9 mL



escala de papel milimetrado. Se debe realizar una gráfica donde en el eje X se indiquen las concentraciones de soluciones patrón de vitamina C y en el eje Y sus respectivas absorbancias obtenidas. La concentración de la muestra problema se debe interpolar con la absorbancia medida a partir de la recta generada.

Un hombre sano elimina un 10% o más de la dosis administrada en las primeras 6 horas. Si no ocurre así, el test se repite tantas veces como sea necesario hasta alcanzar ese valor. Si se realizan más de tres intentos puede indicar deficiencias latentes, o en casos más extremos, escorbuto.

BIBLIOGRAFÍA

- Arrigoni O, De Tullio MC (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta* 1569:1-9.
- Fidanza F (1991). *Nutritional Status Assessment. A manual for population studies*. Chapman & Hall, Londres.
- Gibson RS (1990). *Principles of nutritional assessment*. Oxford University Press, Oxford.
- Linder M (1992). *Nutritional biochemistry and metabolism: with clinical applications*. Elsevier, Amsterdam.
- Shills M, Olson JA, Shike M (1997). *Modern nutrition in health and disease*. Lea Fabiger, Filadelfia.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Volumen de orina [mL]

mg ácido ascórbico/6 horas



COMENTARIOS

Estudio del efecto de la vitamina D en el recambio óseo mediante el análisis de marcadores bioquímicos: hidroxiprolina y calcio en orina

C. Bald Garmendia

INTRODUCCIÓN

El tejido óseo, además de ser el soporte, es la reserva de calcio del organismo. Es un sistema dinámico en el cual tienen lugar continuamente procesos de formación y resorción de hueso, es decir, que está en constante renovación o remodelación. Estos procesos constituyen el denominado **recambio óseo**.

La vitamina D ejerce un papel fundamental en la homeostasis del calcio y en el metabolismo óseo. Puede ser biosintetizada en la piel por un proceso no enzimático catalizado por la radiación ultravioleta, pero la mayor parte de ella se adquiere a través de ciertos alimentos. Su forma activada tras la acción del riñón y del hígado, el calcitriol o 1- α , 25-dihidroxicolecalciferol, abreviado 1,25-(OH) $_2$ D $_3$, tiene un efecto hipercalcemiante, pues favorece la absorción de calcio en el intestino, incrementa su reabsorción en el riñón y libera calcio desde el hueso al plasma. Además, la vitamina D afecta al recambio óseo modulando la sensibilidad a ciertas hormonas por parte de las células óseas a favor de la formación de hueso.

La deficiencia en vitamina D es causa del raquitismo en niños y osteomalacia en adultos, caracterizadas, entre otros, por una deficiente mineralización del hueso e hipocalcemia. El suplemento de vitamina D tiene un efecto supresor de la resorción ósea, estimulador de la absorción intestinal de calcio y parece mejorar la supervivencia de los osteoblastos, células formadoras de hueso, por lo que combinado con calcio se ha recomendado en personas con alto riesgo de padecer osteoporosis o pérdida de hueso.

Si bien a dosis elevadas la vitamina D tiene un efecto anabolizante en el hueso, el exceso de vita-

mina D e incluso un tratamiento muy prolongado pueden dar lugar a efectos tóxicos, fundamentalmente hipercalcemia e hipercalciuria, con riesgo de aparición de calcificaciones en órganos, como en los riñones.

La hidroxiprolina es un aminoácido específico del colágeno, constituyente principal de la sustancia intercelular o matriz mineralizada del tejido óseo. Sólo se encuentra formando parte de esta proteína o en forma libre procedente del metabolismo del colágeno. Si bien la mayor parte es catabolizada en el hígado, una fracción de la hidroxiprolina liberada como consecuencia de la degradación del colágeno es excretada por el riñón. Por ello, la determinación de la cantidad de hidroxiprolina eliminada a través de la orina es un parámetro que puede ser utilizado como indicador de la resorción ósea.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica consiste en estudiar el efecto de la vitamina D sobre el metabolismo óseo de ratas a través de la determinación en orina de dos marcadores bioquímicos de la resorción de hueso: la hidroxiprolina y el calcio.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

El método que se describe para la determinación de la hidroxiprolina es una adaptación del método de Firschein y Shill (1966), basado en una modificación del método de Woessner (1961)

para la determinación en orina. Este método se basa en la oxidación de la hidroxiprolina por la cloramina T y posterior reacción de esta con el *p*-dimetilaminobenzaldehído para originar un cromóforo cuya presencia se determina por colorimetría.

El método descrito para la determinación de la concentración de calcio en orina se basa en la precipitación en forma de oxalato cálcico que, posteriormente, se separa y valora con permanganato potásico.

Material y equipos

Muestras y/o material biológico

- Ratas en crecimiento.
- Dieta estándar conteniendo 1.000 UI de vitamina D₃/kg.

Equipos

- Jaulas de metabolismo.
- Balanza de precisión.
- pHmetro.
- Estufa de secado.
- Agitador de tubos (vórtex).
- Baño de agua con termostato.
- Placas calefactoras.
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro.
- Mufla.

Material

General

- Botes de recogida de orina.
- Probetas.

Análisis de hidroxiprolina

- Pipetas y micropipetas.
- Tubos Pyrex con tapón de rosca.
- Gradillas metálicas.
- Tubos de ensayo desechables.

Análisis de calcio

- Crisoles.
- Matraces aforados de 100 mL.

- Matraces Erlenmeyer.
- Buretas, soportes, pinzas y nueces.
- Papel de filtro.
- Bomba de vacío con pipeta Pasteur acoplada en el extremo para aspiración
- Tubos de centrifuga de fondo curvo de 5 y 15 mL y gradillas.

Reactivos

Generales

- Vitamina D₃.

Análisis de hidroxiprolina

- 2-metoxietanol (metilcelosolve).
- Ácido cítrico monohidratado.
- Ácido acético glacial.
- Acetato sódico dihidratado.
- NaOH 2,5 N.
- Cloramina T.
- HClO₄.
- *p*-dimetilaminobenzaldehído.
- L-hidroxiprolina.
- HCl (c).
- HCl 0,1 N.

Preparación de reactivos

- HCl 0,001 N (puede prepararse a partir de HCl 0,1 N).
- Tampón cítrico/acetato pH = 6,0, que contiene:

ácido cítrico monohidratado	50 g
ácido acético glacial	12 mL
acetato sódico dihidratado	120 g
hidróxido sódico	34 g
agua destilada	c.s.p. 1 L

Se ajusta a pH 6.0 y se guarda en frasco de topacio a 4 °C.

- Reactivo con cloramina T: se prepara diariamente una disolución 0,05 M, para lo que se disuelven 0,70 g de cloramina T en 10 mL de agua destilada. Una vez disueltos, se añaden 15 mL de 2-metoxietanol y 25 mL de tampón cítrico/acetato.
- Disolución 3,15 M de HClO₄ al 60%: se puede almacenar a 4 °C, utilizando para ello un frasco de topacio.

- Reactivo de *p*-dimetilaminobenzaldehído: también se ha de preparar diariamente. Se trata de una disolución al 20% en peso para cuya preparación se pesan 20 g de *p*-dimetilaminobenzaldehído y se disuelven hasta un volumen final de 100 mL de metilcelosolve (2-metoxietanol), calentando a 40 °C para facilitar la solubilización.
- Patrón de hidroxiprolina (10 µg/mL): se prepara diariamente mediante la disolución de 25 mg de L-hidroxiprolina desecada en 25 mL de HCl 0,001 N, y posteriormente se diluye 1/100 con agua destilada.

Análisis de calcio

- HCl (c).
- NH₄OH al 0,5%.
- H₂SO₄ al 20%.
- KMnO₄ 0,02 N.
- NaOH 10 N.
- Disolución saturada de oxalato amónico.

Protocolo

Se escogen ratas en período de crecimiento del mismo sexo, se estabulan individualmente en jaulas metabólicas, se distribuyen en 2 grupos y durante al menos 14 días se les alimenta con la dieta estándar (dieta A) y con la misma dieta suplementada con 1.000 UI/kg de vitamina D₃ (1 UI de vitamina D equivale a 0,025 µg) conteniendo así 2.000 UI/kg (dieta B), respectivamente. El último día se les recoge la orina, se mide el volumen excretado y se determinan las cantidades de hidroxiprolina y de calcio excretadas en 24 horas como se describe a continuación. Puede determinarse también el contenido en creatinina siguiendo el protocolo descrito en otros capítulos de este libro para comprobar si hay influencia sobre los resultados anteriores de posibles diferencias en la función renal de cada individuo.

Determinación de hidroxiprolina urinaria total

1. En un tubo Pyrex con tapa de rosca con teflón se hidrolizan 2 mL de orina con 2 mL de HCl (c) durante 22 horas en estufa programada a 105 °C.

2. Una vez que se hayan enfriado los tubos, se comprueba el volumen del hidrolizado, se toma una alícuota de 1 mL y se neutraliza con NaOH 2,5 N hasta obtener un pH entre 6 y 7, midiéndose el volumen total de la muestra neutralizada. De esta última se toma una alícuota de 1 mL para la reacción y determinación colorimétrica.
3. Para evitar la aparición de posos que pudieran interferir con la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro, las alícuotas neutralizadas pueden centrifugarse a 600-800 g durante 10 minutos.
4. Se preparan por duplicado los siguientes tubos:

Tubos	Patrón (mL)	Agua (mL)	Muestra (mL)
Blanco	–	2,00	–
Patrón I	0,20	1,80	–
Patrón II	0,40	1,60	–
Patrón III	0,50	1,50	–
Patrón IV	0,60	1,40	–
Muestra	–	1,00	1,00

5. Se añade a cada tubo 1 mL de cloramina T (siguiendo un orden concreto) con el fin de producir la oxidación de la hidroxiprolina. Se agita cada tubo con ayuda de un vórtex y se deja reposar 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Para eliminar el exceso de cloramina T que haya podido quedar en los tubos, se añade a cada uno de ellos 1 mL de HClO₄ 3,15 M en el mismo orden en el que antes se añadió la cloramina T. Se agita de nuevo cada tubo y se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Se añade 1 mL de *p*-dimetilaminobenzaldehído a cada tubo en el orden establecido, se agitan los tubos y se colocan en un baño de agua a 60 °C durante 20 minutos. Tras esto, se enfrían los tubos en agua a temperatura ambiente durante 5 minutos.
8. Se mide la absorbancia de cada tubo (muestras y patrones) en un espectrofotómetro a 557 nm. El grado de color producido será proporcional al contenido en hidroxiprolina.

Determinación de la concentración de calcio en orina

1. En primer lugar se procede a la precipitación del calcio. Para ello se toman 10 mL de orina

en un tubo de centrifuga de 15 mL. Se añade 1 mL de la disolución saturada de oxalato amónico y se deja reposar unas 12 horas.

- Se centrifuga a 1.000 g durante 10 minutos y se descartan los sobrenadantes aspirándolos con ayuda de la bomba de vacío.
- Se lavan los precipitados con 2 mL de NH_4OH al 0,5%, agitando y centrifugando 5 minutos. Se descartan los sobrenadantes. Se repite el lavado tres veces.
- Se disuelven los precipitados en 2 mL de H_2SO_4 al 20% y se trasvasan con tres porciones de 5 mL de agua a matraces Erlenmeyer de 100 mL.
- Para la valoración del calcio, en baño a 70-80 °C se valoran con KMnO_4 0,02 N hasta la aparición de color rosa persistente durante al menos 1 minuto.

Cálculos

Determinación de hidroxiprolina urinaria total

Se introducen los resultados de la lectura del espectrofotómetro en la calculadora u ordenador para obtener la fórmula de la recta de regresión, o se dibuja en papel milimetrado la recta patrón o recta de calibrado, representando en abscisas la concentración de hidroxiprolina en los tubos patrones y en ordenadas los valores de absorbancia correspondientes.

El contenido en hidroxiprolina para cada muestra se calcula a partir de los datos del espectrofotómetro y mediante el empleo de la recta de calibrado obtenida a partir de los patrones de hidroxiprolina.

Se indica cuáles son los volúmenes de hidrólisis, de neutralización y el volumen de orina recogido en 24 horas de cada animal.

Una vez conocida la concentración de hidroxiprolina en cada muestra, la determinación de la cantidad de aminoácido, expresada como μg de hidroxiprolina/24 horas se puede obtener por medio de la fórmula:

$$\mu\text{g Hidroxiprolina/24 horas} = (c \times V_n \times V_h \times w) / 2$$

c : cantidad de hidroxiprolina calculada en la recta patrón

V_n : volumen de neutralización

V_h : volumen de hidrólisis

w : volumen excretado de orina en 24 horas

Determinación de la concentración de calcio en orina

Sabiendo que 1 mL de KMnO_4 0,02 N equivale a 0,4 mg de calcio y teniendo en cuenta las diluciones y alícuotas tomadas se calcula el contenido en calcio y se expresa en mmol/24 h.

BIBLIOGRAFÍA

- Cremers S, Garnero P y Seibel MJ (2008). Biochemical Markers of Bone Metabolism. En "Principles of Bone Biology" (Third Edition), pp. 1857-1881. J.P. Bilezikian, L.G. Raisz y T. John Martin (eds.). Elsevier Inc.
- Dunstan CR, Blair JM, Zhou H y Seibel MJ (2007). Bone, Mineral, Connective Tissue Metabolism. Comprehensive Medicinal Chemistry II, Vol. 6, Cap. 21, pp. 495-520. J.B. Taylor y D.J. Triggle (eds.). Elsevier Ltd.
- Stern PH (2005). Bone. En "Vitamin D". Volumen 1, pp. 565-573. D. Feldman, J. Wesley Pike y F.H. Glorieux (eds.). Elsevier Inc.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

	Dieta A	Dieta B
$\mu\text{g Hyp/24 h}$		
mmol Ca/24 h		

Los resultados suelen expresarse también en mg de hidroxiprolina/mg de creatinina o en mmol de hidroxiprolina/mol de creatinina y en mmol calcio/mmol creatinina respectivamente.

COMENTARIOS



Efectos tóxicos del alcohol: cirrosis hepática

M. T. Macarulla Arenaza, C. Bald Garmendia y V. M. Rodríguez Rivera

INTRODUCCIÓN

El alcohol etílico o etanol se puede considerar como nutriente, puesto que es un componente de los alimentos que aporta energía, pero también como tóxico, ya que cuando se ingiere en exceso de modo agudo o crónico provoca embriaguez y alcoholismo, respectivamente. La ingesta crónica abusiva de alcohol afecta a numerosos órganos y tejidos, especialmente al hígado, pudiendo llegar a originar, entre otras alteraciones, hepatitis, hepatomegalia, esteatosis, cirrosis (que histológicamente se caracteriza por fibrosis) y liberación de enzimas hepáticas a sangre.

La esteatosis, o acumulación excesiva de grasa, se debe a un incremento de su síntesis hepática al que se añade una disminución de su vertido a sangre por alteración de la síntesis y secreción de las lipoproteínas VLDL; la fibrosis se debe a la sustitución de las células del parénquima por tejido fibroso y se caracteriza por un aumento del contenido en colágeno de la matriz extracelular; y la liberación de enzimas hepáticas a sangre es producto de la propia lesión hepática.

Entre estas enzimas se encuentran las transaminasas o aminotransferasas GOT o AST (glutamato-oxalacetato transaminasa o aspartato aminotransferasa) y GPT o ALT (glutamato-piruvato transaminasa o alanina aminotransferasa). Sin embargo, puesto que ambas enzimas se localizan también en otros órganos y tejidos (corazón, riñón, músculo, encéfalo, etc.), sus niveles sanguíneos elevados pueden ser indicativos no sólo de daño hepático, sino también de alteraciones de los otros órganos y tejidos donde se encuentran. Por tanto, para el diagnóstico diferencial se hace necesario el análisis simultáneo de ambas. Así, mientras que

en el infarto de miocardio, lesiones musculares graves, pancreatitis aguda, colitis ulcerosa, diversas enfermedades infecciosas, etc., aumenta mayoritariamente la AST, en la hepatitis aguda ambas suben de manera similar o algo más la ALT que la AST ($AST/ALT < 1$), y en la hepatitis alcohólica y la cirrosis la AST es mayor que la ALT ($AST/ALT > 1$).

OBJETIVO

En esta sesión práctica se van a estudiar, en ratas con alcoholismo inducido, tres de las principales manifestaciones hepáticas: el aumento de GOT y GPT en sangre, la esteatosis (a través de la cuantificación del contenido graso), y la fibrosis (mediante la valoración del contenido en colágeno).

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Valoración de las transaminasas GOT y GPT en suero

La GOT o AST cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al 2-oxoglutarato, formando oxalacetato y glutamato (a). Su concentración catalítica se determina empleando la reacción acoplada de la malato deshidrogenasa (b) y midiendo la velocidad de desaparición del NADH:

- Aspartato + 2-Oxoglutarato \rightarrow Oxalacetato + Glutamato
- Oxalacetato + NADH + H⁺ \rightarrow Malato + NAD⁺

La GPT o ALT cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al 2-oxoglutarato, formando piruvato y glutamato (c). Su concentración catalítica se determina empleando la reacción acoplada de la lactato deshidrogenasa (d) y midiendo la velocidad de desaparición del NADH:

- c) Alanina + 2-Oxoglutarato \rightarrow Piruvato + Glutamato
 d) Piruvato + NADH + H⁺ \rightarrow Lactato + NAD⁺

Valoración del contenido graso del hígado

El contenido graso del hígado se determina mediante la técnica basada en el método de Folch y col. (1957), que consiste en la extracción con disolventes orgánicos de la fracción lipídica de una cantidad conocida de tejido. La posterior desecación del disolvente que la contiene permite conocer por gravimetría la cantidad de grasa del tejido analizado.

Valoración del contenido en colágeno del hígado

La hidroxiprolina es un aminoácido que se encuentra de manera casi exclusiva en el colágeno, por lo que su determinación tisular permite evaluar el contenido en colágeno del tejido. La concentración tisular de hidroxiprolina se valora, previa digestión del tejido, mediante el método descrito en la práctica 17, que se basa en la oxidación de la hidroxiprolina por la cloramina T y posterior reacción de ésta con *p*-dimetilaminobenzaldehído, lo que origina un cromóforo que se determina por colorimetría.

Material y equipos

Material biológico

- Ratas.

Equipos

- Balanzas.
- Cámara de anestesia inhalatoria.
- Centrífuga.
- Baño termostático.

Material general

- Jeringas y agujas.
- Material de disección: pinzas y tijeras.
- Tubos y gradillas.
- Pipetas, micropipetas y puntas de micropipetas.

Material específico para valorar GOT y GPT en suero

- Espectrofotómetro y cubetas.

Material específico para valorar el contenido graso del hígado

- Ultratúrrax.
- Vórtex.
- Bomba de vacío.
- Tubos con tapón y marca de volumen.
- Tubos Eppendorf.
- Corriente de nitrógeno.

Material específico para valorar el contenido en colágeno del hígado

- Estufa de secado (o liofilizador).
- Mortero.

Reactivos generales

- Alcohol etílico.
- Éter etílico.

Reactivos específicos para valorar GOT y GPT en suero

- Reactivo A: Tris 121 mmol/L, L-aspartato 362 mmol/L, malato deshidrogenasa > 460 U/L, lactato deshidrogenasa > 660 U/L y NaOH 255 mmol/L, pH 7,8.
- Reactivo B: Tris 150 mmol/L, L-alanina 750 mmol/L y lactato deshidrogenasa > 1.350 U/L, pH 7,3.
- Reactivo C: NADH 1,3 mmol/L, 2-oxoglutarato 75 mmol/L, NaOH 148 mmol/L y azida sódica 9,5 g/L.

- Reactivo D: se prepara en el momento de uso mezclando los reactivos A y C en proporción 4:1.
- Reactivo E: se prepara en el momento de uso mezclando los reactivos B y C en proporción 4:1.

Reactivos específicos para valorar el contenido graso del hígado

- NaCl 0,15 M.
- KCl 0,1 M.
- Cloroformo.
- Cloroformo/metanol (2:1; v/v).

Reactivos específicos para valorar el contenido en colágeno del hígado

- HCl 6 N.
- El necesario para la determinación de la hidroxiprolina (ver práctica 17).

Protocolo

Se distribuyen los animales en dos grupos homogéneos: el grupo control (sanos) y el experimental (alcoholizados). Para alcoholizar a los segundos, durante al menos 6 semanas se les suministra etanol mezclado con el agua de bebida de modo creciente: al 10% durante la primera semana, al 20% durante la segunda, al 30% durante la tercera y al 40% durante la cuarta y subsiguientes.

Terminado este período, se anestesia a todos los animales por inhalación de éter etílico, se obtienen muestras de sangre por punción cardíaca, y se diseccionan y pesan sus hígados. Las muestras de sangre se centrifugan 10 min a 1.000 g para obtener el suero.

Valoración de las transaminasas GOT y GPT en suero

1. Para valorar la AST (GOT) se prepara un tubo con 1,0 mL del reactivo D precalentado a 37 °C, y se añaden 50 µL de suero.
2. Se incuba el tubo a 37 °C y se lee su absorbancia a 340 nm a tiempos 1, 2 y 3 min.
3. Se calcula el incremento de absorbancia por minuto promedio ($\Delta A/\text{min}$).

4. La concentración catalítica de AST de la muestra se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{AST (U/L)} = (\Delta A/\text{min} \times V_t \times 10^6) / (\epsilon \times L \times V_m)$$

siendo V_t el volumen total en el tubo (1,05 mL), ϵ el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm (6.300), L el paso de luz por la cubeta (1 cm) y V_m el volumen de muestra (0,05 mL).

5. Para valorar la ALT (GPT) se procede de idéntica manera utilizando el reactivo E.

Valoración del contenido graso del hígado

1. Se toma una muestra de hígado de entre 0,5 y 1 g y se lava con suero fisiológico (NaCl 0,15 M) para eliminar restos de sangre.
2. Se homogeniza el tejido con ultraturrax en un tubo con 6 mL de la mezcla cloroformo/metanol. El homogenado se trasvasa a un tubo con tapón, y se recuperan los posibles restos lipídicos lavando tanto el tubo en el que se ha homogeneizado la muestra como el vástago del ultraturrax con 3 mL de cloroformo/metanol, que se incorporan al homogenizado.
3. Tras tapar el tubo se agita con un vórtex durante 1 min y se incuba a 50 °C durante 30 min.
4. Se añaden 2 mL de KCl 0,1 M y se vuelve a agitar durante 1 min.
5. Se deja reposar la muestra 2 horas a 4 °C, y se centrifuga a 1.000 g durante 20 min para favorecer la separación de las fases. La fase superior o acuosa habrá arrastrado el metanol, y la inferior o clorofórmica contendrá los lípidos.
6. Se retira la fase acuosa mediante una bomba de vacío y se ajusta la fase clorofórmica a un volumen final conocido con cloroformo.
7. Se vierte 1 mL de la fase clorofórmica en un tubo Eppendorf previamente pesado, y se evapora hasta sequedad mediante corriente de nitrógeno (el empleo de calor acelera el proceso).
8. Se pesa el tubo Eppendorf con la grasa y, por diferencia con el peso del tubo vacío, se calcula la cantidad de grasa contenida en 1 mL de la fracción clorofórmica.
9. Teniendo en cuenta el volumen total de la fracción clorofórmica y el peso de la muestra de tejido utilizada, se calcula el contenido graso del hígado, que se expresa en mg/g.

Valoración del contenido en colágeno del hígado

1. Se toma una muestra de unos 2 g de hígado que, o bien se liofiliza, o bien se deseca en estufa a 105 °C hasta peso constante.
2. La muestra desecada se tritura homogéneamente y se toman 10 mg, que se hidrolizan con 1 mL de HCl 6 N a 105 °C durante 24 h en tubos Pyrex con tapa de rosca.
3. Una vez enfriada la muestra, se neutraliza con NaOH 2,5 N hasta obtener un pH entre 6 y 7, y se mide el volumen total de la muestra neutralizada.
4. Se toma una alícuota de 1 mL y se determina su concentración en hidroxiprolina conforme a lo descrito en la práctica 17.
5. La cantidad de hidroxiprolina del tejido desecado se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Hidroxiprolina } (\mu\text{g/mg o mg/g}) = C \times V_n / P$$

siendo *C* la cantidad de hidroxiprolina determinada mediante la recta patrón ($\mu\text{g/mL}$), V_n el volumen total de la muestra neutralizada

(mL) y *P* el peso de la muestra desecada utilizada (10 mg).

BIBLIOGRAFÍA

- Dias JV, Paredes BD, Mesquita LF, Carvalho AB, Kozlowski EO, Lessa AS, Takiya CM, Resende CM, Coelho HS, Campos-de-Carvalho AC, Rezende GF, Goldenberg RC (2008). An ultrasound and histomorphological analysis of experimental liver cirrhosis in rats. *Braz J Med Biol Res* 41:992-999.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509.
- Macarulla MT (2008). Utilización y metabolismo del alcohol, en "Bases de la Alimentación Humana", pp. 343-355, V.M. Rodríguez y E. Simón (eds.). Netbiblo, La Coruña.
- Marcos Martín M, Pastor Encinas I, Laso Guzmán FJ (2005). Marcadores biológicos del alcoholismo. *Rev Clin Esp* 205:443-445.
- Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 245:194-205.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Parámetros	Animales sanos	Animales alcoholizados
AST (U/L)		
ALT (U/L)		
AST/ALT		
Peso del hígado [g]		
Contenido en grasa [mg/g]		
Contenido en hidroxiprolina [mg/g]		

COMENTARIOS

Estudio del metabolismo basal en humanos

B. Martínez de Morentin Aldabe, M. Hernández Ruiz de Eguilaz y J. A. Martínez Hernández

INTRODUCCIÓN

El organismo tiene unas necesidades energéticas destinadas a mantener las funciones vitales tales como la respiración, la circulación sanguínea, el transporte de iones a través de las membranas, el mantenimiento de la temperatura, etc., es lo que se denomina metabolismo basal. El metabolismo basal constituye normalmente la fracción cuantitativamente más importante del gasto energético total, pudiendo suponer entre el 60-75% del mismo.

Varios factores influyen en el metabolismo basal, como el tamaño y superficie corporal, el sexo, la edad, la composición corporal, situaciones especiales como embarazo, lactancia, fiebre, algunas enfermedades, administración de determinados fármacos, factores genéticos, la actividad del sistema nervioso simpático y la función tiroidea, entre otros.

OBJETIVO

Se va a llevar a cabo las siguientes determinaciones: obtención del metabolismo basal en humanos cuantificado mediante diferentes métodos. Medida del gasto energético realizando actividad física aeróbica y cuantificar el gasto energético después de la realización de dicha actividad y comparar estos valores con el metabolismo basal obtenido anteriormente.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

El metabolismo en reposo cuantificado mediante calorimetría indirecta, se calcula por medio

de ecuaciones validadas a partir del volumen de oxígeno consumido y de dióxido de carbono producido. Utilizando la ecuación abreviada de Weir:

$$\text{GER} = [3.941 (\text{VO}_2) + 1,11 (\text{VCO}_2)] 1,44$$

Dando el propio aparato un informe completo del metabolismo en reposo obtenido en kilocalorías/día.

En cuanto al equipo de metabolimetría multi-sensorial, el aparato registra las señales fisiológicas provenientes de cinco sensores: dos acelerómetros, temperatura corporal, disipación térmica e impedancia de la piel/grado de humedad. A partir de estas señales y por medio de algoritmos específicos, se determina el consumo energético diario de una persona. Para el adecuado análisis de los datos obtenidos se utiliza el programa informático desarrollado por el fabricante.

El aparato de calorimetría indirecta portátil mide el consumo de oxígeno en milímetros por minuto y el gasto energético en reposo en kilocalorías/día, utilizando para el cálculo de nuevo la ecuación de Weir. El instrumento controla el flujo de aire inspirado/ espirado y las condiciones ambientales.

Si la medición se realiza durante la actividad física o después de su realización, se observa un incremento del gasto energético, ya que se está valorando otro de los componentes que conforman el gasto energético total, que es la actividad física.

Material y equipos

- Calorimetría indirecta, mediante calorímetro de circuito abierto automatizado.

- Monitor metabólico de actividad física.
- Aparato de calorimetría indirecta portátil.
- Fórmulas, nomogramas y tablas de referencia.
- Bicicleta estática.
- Pulsómetro.

Protocolo

1. El primer paso a realizar debe ser efectuar la calibración del calorímetro de circuito abierto automatizado, mediante la detección de la composición del aire de la estancia, frente a una mezcla gaseosa estándar de oxígeno (95%) y dióxido de carbono (5%). Una vez realizado esto se deben introducir los datos demográficos del voluntario tanto en el calorímetro como en el monitor metabólico de actividad física: fecha de nacimiento, sexo, estatura y peso.
2. A continuación, se debe colocar el monitor de actividad física (equipo de metabolimetría multisensorial) en la forma adecuada, y medir el intercambio gaseoso de manera continua durante 30 min mediante el calorímetro de circuito abierto automatizado. Para ello se utilizará un sistema de canopia ventilada y de forma simultánea se medirá el gasto energético con el monitor de actividad física.
3. Es importante instruir correctamente al voluntario sobre el manejo del aparato de calorimetría indirecta portátil y realizar la medición. Posteriormente, el voluntario realizará durante 10 minutos actividad física utilizando una bicicleta estática, mientras se mantiene la medición con el monitor metabólico de actividad física y se valora la frecuencia cardíaca a través de un pulsómetro que se le colocará.
4. Una vez finalizada la actividad física se volverá a realizar las mediciones con los tres aparatos, ya en reposo, y se estimará el gasto energético en reposo teórico utilizando diferentes fórmulas. Finalmente, y tras la obtención de resultados, se compararán los proporcionados por métodos de medida con los obtenidos a través de las fórmulas.

Consideraciones para la correcta realización de la práctica

Para la realización de la práctica debe cumplir una serie de requisitos:

1. Las determinaciones del metabolismo en reposo se deben realizar a primera hora de la mañana, el sujeto elegido para su realización se debe encontrar en estado posabsortivo de 12 h, período durante el cual tampoco debe fumar. En las 24 h anteriores a las pruebas no se puede realizar ningún tipo de ejercicio físico intenso.
2. La medición del gasto energético en reposo debe realizarse en un ambiente termoestable (20-21 °C), silencioso y tranquilo para que se encuentre en descanso tanto físico como mental, en decúbito supino sobre una camilla permaneciendo en todo momento despierto.
3. El equipo de metabolimetría multisensorial se debe colocar en la zona media del brazo entre el acromion y olécranon, sobre el tríceps del brazo derecho.
4. Para llevar a cabo la prueba con el aparato de calorimetría indirecta portátil, se utiliza una boquilla que se inserta en el tubo de flujo y un clip de nariz, ambos desechables. El voluntario respirará de forma relajada y normal en la boquilla, sellándola bien con la boca, y se le colocará el clip en la nariz, cerrando completamente las fosas nasales para que no hubiera escape de aire. La prueba durará aproximadamente 8-10 min, después de los cuales aparece en la pantalla la tasa metabólica en reposo.
5. La prueba de actividad física se llevará a cabo utilizando una bicicleta estática, pedaleando aproximadamente durante 10 minutos. El voluntario no deberá sobrepasar el 85% de la frecuencia cardíaca máxima para su edad, que se estimará con la fórmula:

$$FC_{\max} = (220 - \text{edad}) \times 0,85$$

Cálculos

El gasto energético en reposo se estimará de forma teórica con las ecuaciones de Harris-Benedict y según las fórmulas de la OMS, obteniendo los resultados en kcal/día.

$$\text{MB mujeres} = 655 + (9,56 \times P) + (1,85 \times T) - (4,68 \times E)$$

$$\text{MB varones} = 66,5 + (13,75 \times P) + (5 \times T) - (6,78 \times E)$$

E: edad en años; P: peso en kg; T: talla en cm

OMS. Gasto energético en reposo (kcal/día)

Edad (en años)	Hombres	Mujeres
< 3	MB = 60,9 P - 54	MB = 61 P - 51
3-10	MB = 22,7 P + 495	MB = 22,5 P + 499
10-18	MB = 17,5 P + 651	MB = 12,2 P + 746
18-30	MB = 15,3 P + 679	MB = 14,7 P + 496
30-60	MB = 11,6 P + 879	MB = 8,7 P + 829
> 60	MB = 13,5 P + 487	MB = 10,5 P + 596

P = peso en kg

BIBLIOGRAFÍA

- López-Fontana CM, Martínez-González MA y Martínez JA (2003). Obesidad, metabolismo energético y medida de la actividad física. *Rev Esp Obes* 1: 29-36.
- Martínez de Morentin BE, Pérez-Díez S, Hernández M y Martínez A (2009). Comparación de diferentes métodos de estimación del gasto energético de adultos obesos en reposo. *Actividad Dietética* 13:3-9.
- Marsé P, Díez M y Raurich JM (2008). Calorimetría: aplicaciones y manejo. *Nutr Clin Med* 3:155-166.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

	mL VO ₂	mL VCO ₂	GE kcal/día
Calorimetría indirecta			
Monitor metabólico de actividad física			
Calorimetría indirecta portátil			
Harris-Benedict			
OMS			

Actividad física

	mL VO ₂	mL VCO ₂	GE kcal/día
Calorimetría indirecta			
Monitor metabólico de actividad física			
Calorimetría indirecta portátil			



COMENTARIOS

Determinación del grado de utilización energética de los alimentos a partir del cociente respiratorio

F. I. Milagro Yoldi y D. Ansorena Artieda

INTRODUCCIÓN

El organismo, a través de los alimentos, obtiene la energía necesaria para el mantenimiento de sus funciones fisiológicas (metabolismo basal), para la acción termogénica de los alimentos (producción de calor tras la ingestión de alimentos) y para llevar a cabo la actividad física que cada individuo desarrolla. Mediante reacciones de combustión de los lípidos, glúcidos y proteínas en las que tiene lugar consumo de oxígeno, se obtiene la energía necesaria para el funcionamiento celular (ATP) y se produce CO_2 como materia de desecho, como se indica en la siguiente ecuación:

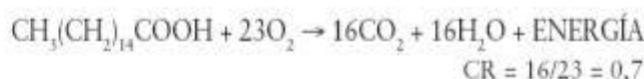
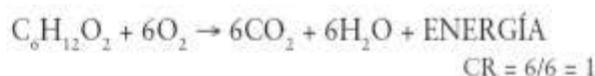


La calorimetría indirecta es un método que permite la medición del oxígeno consumido y/o del dióxido de carbono producido por el individuo. Es un método eficaz y fiable para determinar el gasto energético, pero además permite calcular el **cociente respiratorio** (CR), que se define como la relación entre la producción de CO_2 y el consumo de O_2 por el organismo.

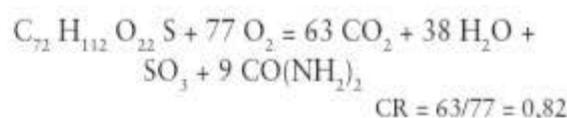
$$\text{Cociente respiratorio} = \text{CO}_2 \text{ espirado} / \text{O}_2 \text{ inspirado}$$

Es un parámetro que indica los nutrientes que preferentemente oxida el sujeto y que permite introducir modificaciones en el soporte nutricional individual. La oxidación de un 100% de lípidos daría lugar a un CR de 0,7, un 100% de glúcidos daría un CR de 1 y la oxidación de un 100% de proteínas tendría como resultado un CR de 0,81-0,85.

Como ejemplos, la ecuación energética ajustada para los principales sustratos energéticos (glucosa y un ácido graso, en este caso el ácido palmítico), muestra empíricamente el origen del cociente respiratorio:



En relación a las proteínas, en la siguiente ecuación se observa que su combustión (en este caso de la albúmina) no sólo produce CO_2 sino también trióxido de azufre y urea. Esta última molécula es la manera de eliminar el nitrógeno, el cual no puede ser oxidado. Por tanto, para medir la contribución de las proteínas al metabolismo energético se debe realizar con anterioridad la determinación del nitrógeno urinario.



Dado que las proteínas no actúan como una reserva energética específica en el organismo sino que ejercen predominantemente un rol funcional, el valor habitual de cociente respiratorio es el **cociente respiratorio no proteico**, que sólo tiene en cuenta el porcentaje de grasas e hidratos de carbono oxidados.

La tabla P20-1 da idea de la variación del cociente respiratorio no proteico según la proporción de sustratos energéticos oxidados en ese momento:

Tabla P20-1.

CR	HC (%)	Grasas (%)
0,71	0	100
0,75	15,6	84,0
0,80	33,4	66,6
0,85	50,7	49,3
0,90	67,5	32,5
0,95	84,0	16,0
1,00	100	0

En reposo, el organismo obtiene energía fundamentalmente por oxidación de grasas, con un bajo consumo de hidratos de carbono. Sin embargo, al comienzo del ejercicio y durante un ejercicio prolongado, las proporciones de glucosa, ácidos grasos y otros sustratos energéticos consumidos pueden modificarse en función de la duración, intensidad y tipo de actividad, así como de la dieta previa seguida.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es la determinación del cociente respiratorio mediante calorimetría indirecta en determinadas situaciones metabólicas y nutricionales. Se pretende valorar la influencia de la actividad física y de la dieta en la utilización de nutrientes por el organismo.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

El desarrollo de la práctica es muy sencillo. Los individuos participantes serán monitorizados mediante el aparato de calorimetría indirecta durante un período de 15 minutos, tras los cuales se podrá obtener el valor del consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono, y por tanto, el cociente respiratorio.

Material y reactivos

Para medir el cociente respiratorio se empleará un **metabolímetro o calorímetro indirecto tipo Deltatrac** (Fig. P21-1 y P21-2). El calorímetro permite medir el oxígeno inhalado gracias a un sensor paramagnético de tipo Datex-Ohmeda. El CO₂ es cuantificado gracias a un sistema de radiación infrarroja en el gas espirado. La persona respira directamente el gas de la habitación y el calorímetro detecta las concentraciones de CO₂ y de O₂ de manera directa.

Las diferentes condiciones metabólicas que se van a estudiar son las siguientes:

Caso 1: Efecto del ejercicio físico sobre el cociente respiratorio

En este experimento, el voluntario habrá recibido la siguiente indicación antes de hacer la prueba: el día anterior a la prueba su cena consistirá en un menú rico en grasa y el día de la prueba tomará



Figura P21-1 y P21-2. Disposición operativa del equipo de calorimetría indirecta.

también un desayuno rico en grasa. Al inicio del experimento se monitorizará a esa persona durante 15 minutos con el metabolímetro en condiciones de reposo. Una vez terminada la medición, el voluntario correrá durante unos 20 minutos, a ser posible subiendo (y bajando) escaleras a ritmo moderado, y se le volverá a medir el cociente respiratorio. Se valorará y discutirá el resultado obtenido.

Caso 2: Efecto de diferentes dietas sobre el cociente respiratorio

Este experimento se realizará contando con la colaboración de diferentes personas. Una persona ingerirá una bebida rica en hidratos de carbono (ejemplo, dieta A) mientras que otra persona tomará una preparación con un porcentaje mayor de grasas (ejemplo, dieta B). En los dos casos, el valor calórico total de la bebida ingerida será de unas 500 calorías. A cada persona se le tomarán medidas de calorimetría indirecta (de 15 minutos de duración) justo antes de tomar la bebida y a los 30 minutos de la ingesta de la preparación. Se valorará y discutirá el resultado obtenido para el cociente respiratorio (Tabla P20-2).

Protocolo

- Los voluntarios serán previamente informados de las condiciones en que tienen que acudir a la práctica:
 - estar en reposo tanto mental como físico (no venir andando ni subir escaleras),
 - la habitación debe estar a una temperatura ambiental de aproximadamente 22 °C,
 - realizar la medición en posición horizontal y vestido con ropa ligera.

	Dieta A [% sobre energía total]	Dieta B [% sobre energía total]
Hidratos de carbono	80%	15%
Grasa	2%	67%
Proteína	18%	18%
Energía total	500 kcal	500 kcal

- Justo antes del experimento, los voluntarios tendrán un período de 15-20 minutos de reposo que servirá como período de adaptación al calorímetro.
- Las mediciones de intercambio respiratorio se determinarán por medio de un calorímetro indirecto informatizado de circuito abierto (Deltatrac, Datex-Ohmeda, Finlandia o similar).
- El intercambio respiratorio se medirá de forma continua durante 15 minutos. El aparato desestima por defecto la medida de los primeros 5 minutos por el riesgo de hiperventilación. La media de los restantes 10 minutos es la usada para los cálculos.
- Antes de empezar hay que dejar calentar el calorímetro al menos durante 30 minutos.
- Se debe comprobar el rango de flujo dependiendo del peso del voluntario. Para personas entre 20 y 120 kg es de 40 L/min; para mayores de 120 kg, de 80 L/min.
- El modo de medición es el de "canopia con aire atmosférico".
- Se debe realizar cada día una calibración automática con una mezcla de gases de referencia (95% O₂, 5% CO₂).
- Se cubrirá la cabeza del voluntario con una canopia (escafandra) transparente conectada por un circuito ventilado con el analizador de



Figura P21-3. Elementos del equipo de calorimetría indirecta.

sistema. La boca del paciente estará junto a la salida de la canopia.

10. El faldón de la canopia se debe meter bajo la almohada para evitar la entrada de aire.

BIBLIOGRAFÍA

- Casas-Agustench P, López-Uriarte P, Bulló M, Ros E, Gómez-Flores A, Salas-Salvadó J (2009). Acute effects of three high-fat meals with different fat saturations on energy expenditure, substrate oxidation and satiety. *Clin Nutr* 28(1):39-45.
- Labayen I, Díez N, Parra D, González A, Martínez JA (2004). Basal and postprandial substrate oxidation rates in obese women receiving two test meals with different protein content. *Clinical Nutrition* 23(4):571-8.
- Pillard F, Van Wymelbeke V, Garrigue E, Moro C, Crampes F, Guillard JC, Berlan M, de Gliszinski I, Harant I, Riviére D, Brondel L (2010). Lipid oxidation in overweight men after exercise and food intake. *Metabolism* 59(2):267-74.
- Rodríguez MC, Parra MD, Marques-Lopes I, De Morentin BE, González A, Martínez JA (2005). Effects of two energy-restricted diets containing different fruit amounts on body weight loss and macronutrient oxidation. *Plant Foods Hum Nutr* 60(4):219-24.
- Scazzina F, Del Rio D, Benini L, Melegari C, Pellegrini N, Marazzan E, Brighenti F (2009). The effect of breakfasts varying in glycemic index and glycemic load on dietary induced thermogenesis and respiratory quotient. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 14 (Epub Ahead of print).

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Caso 1:

- Volumen de oxígeno (mL O_2 /min) =
- Volumen de CO_2 (mL CO_2 /min) =
- Cociente respiratorio =

Caso 2:

- Volumen de oxígeno (mL O_2 /min) =
- Volumen de CO_2 (mL CO_2 /min) =
- Cociente respiratorio =
- Comentar los cambios observados en el cociente respiratorio como consecuencia del ejercicio físico y de la ingesta de alimentos ricos en grasas o hidratos de carbono.
- Comentar los cambios en el cociente respiratorio que se puedan originar como consecuencia de las siguientes situaciones:
 - Diabetes mellitus tipo 2, sin medicación.
 - Alcoholismo crónico.
 - Ayuno prolongado.

COMENTARIOS



21. Valoración del peso, la talla y concentración de creatinina en orina
22. Evaluación del crecimiento en la infancia y la adolescencia
23. Composición corporal
24. Intolerancia a hidratos de carbono
25. Evaluación de alteraciones del metabolismo lipídico
26. Determinación de la albúmina, transtiretina, transferrina y proteína transportadora del retinol (RBP) como índices del metabolismo proteico
27. Biodisponibilidad de minerales
28. Actividad glutatión reductasa eritrocitaria como indicador en estados de deficiencia en vitamina B₂
29. Determinación de la vitamina B₆
30. Valoración del estado nutricional en humanos a través de biomarcadores inmunológicos
31. Evaluación bioquímica del estado nutritivo con métodos de diagnóstico rápido

Valoración del peso, la talla y concentración de creatinina en orina

I. Abete Goñi, P. López-Legarrea y R. de la Iglesia González

INTRODUCCIÓN

El estado nutricional refleja en cada momento si la ingestión, la absorción y la utilización de los nutrientes son adecuadas a las necesidades del organismo. Su evaluación debe formar parte del examen rutinario de la persona sana y es un aspecto importante de la exploración clínica del paciente enfermo. Para que la valoración sea completa debe incluir los siguientes aspectos:

- Anamnesis.
- Exploración física.
- Estudio antropométrico.
- Parámetros bioquímicos.

Una vez obtenidos los valores anteriores, existen diversos índices y ecuaciones que los relacionan para conocer el estado nutricional del sujeto, como el **Índice de excreción de creatinina** o **Índice creatinina-altura**.

La excreción urinaria de creatinina se ha utilizado históricamente para la emisión de juicios sobre el estado nutricional de un paciente, la conservación de la masa magra y muscular, y la realización de estudios de composición corporal.

OBJETIVO

El objetivo de la práctica consiste en determinar el estado nutricional de un individuo a partir de la valoración del peso, la talla y el índice de excreción de creatinina en orina con el fin de detectar posibles problemas de malnutrición y poner en marcha las medidas adecuadas para solucionarlos.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

El **peso** es un indicador global de la masa corporal. Es uno de los datos antropométricos de mayor utilidad para valorar el estado de nutrición y refleja alteraciones recientes del mismo.

La **altura** o **talla** es el parámetro fundamental para enjuiciar el crecimiento en longitud, pero es menos sensible que el peso a las deficiencias nutricionales, por eso sólo se afecta en las carencias prolongadas. En nuestro medio, la talla aisladamente tiene muy poco valor para evaluar el estado nutricional, en cambio es extraordinariamente útil combinada con otros datos antropométricos.

La **creatinina** es el producto final del metabolismo de la creatina, molécula energética de síntesis hepática que se encuentra en los músculos. Se produce a una velocidad constante como parte de la actividad muscular diaria. Es excretada por la orina y está relacionada con la masa muscular. A saturación en medio alcalino la creatinina reacciona con el ácido pícrico (**reacción de Jaffé**), formando un complejo rojizo, cuya absorbancia es proporcional a la concentración inicial de creatinina.

Material y equipos

Equipos

- Tallímetro.
- Báscula.
- Calculadora.
- Espectrofotómetro.

Reactivos

- Patrón de creatinina (10 µg/mL).
- Picrato alcalino (ácido pícrico en NaOH).

Protocolo

1. Las medidas de peso corporal y estatura sufren variaciones a lo largo del día, por lo que es deseable realizarlas a primera hora de la mañana:

- Peso: medida en la báscula, con el sujeto descalzo, en ropa interior y sin adornos personales, situado de pie en el centro de la plataforma distribuyendo el peso por igual en ambas piernas, sin que el cuerpo esté en contacto con nada que haya alrededor y con los brazos colgando libremente a ambos lados.
- Talla: medida en el tallímetro, con el sujeto descalzo, guardando la posición de atención antropométrica: de pie, mirando al frente, con los brazos relajados y los talones, glúteos, espalda y región occipital en contacto con el plano vertical del tallímetro.

2. La determinación de creatinina debe hacerse de la forma siguiente:

- Se diluye la orina filtrada: 1:30 con agua destilada.
- Se preparan por duplicado los siguientes tubos (Tabla P21-1).
- Se añade 1 mL de picrato alcalino a todos los tubos, se dejan reposar durante 30 minutos y se leen sus absorbancias a 500 nm.
- Se traza la recta patrón en papel milimetrado y se calcula la concentración de creatinina en la orina (en mg/mL) teniendo en cuenta las diluciones realizadas.

- Conociendo la cantidad de orina eliminada por el paciente en 24 h y su peso corporal, se calcula la excreción total de creatinina por día (en mg/kg/d).

Cálculos

Índice de excreción de creatinina (IEC) o Índice creatinina-altura (ICA)

Dado que la altura no se afecta por la desnutrición, otro indicador útil de la masa muscular es el IEC o ICA. Es la relación entre la excreción de creatinina de un sujeto enfermo y la que tendría si estuviese sano.

$$\text{IEC o ICA} = \frac{\text{Creatinina eliminada en 24 h}}{\text{Creatinina ideal o teórica en 24 h}} \times 100$$

Interpretación del resultado:

- 100-80% Nutrición normal.
- 80-60% Malnutrición leve/depleción proteica leve.
- 60-40% Malnutrición moderada/depleción proteica moderada.
- < 40% Malnutrición severa/depleción proteica severa.

Cálculo de la excreción ideal de creatinina

Sabiendo que los valores normales de excreción de creatinina en personas sanas, con un estado nutricional normal y una función renal correcta son:

- 23 mg/kg/d para el hombre.
- 18 mg/kg/d para la mujer.

Tabla P21-1. ESQUEMA DE DISTRIBUCIÓN DE LOS PATRONES Y MUESTRAS CON PROBLEMAS DE ORINA

	Patrón de creatinina (mL)	Orina diluida (mL)	Agua destilada (mL)
Blanco	-	-	7
Patrón I	1	-	6
Patrón II	2	-	5
Patrón III	3	-	4
Problema	-	1	6

La excreción de creatinina ideal se calcula multiplicando la excreción diaria (en mujer u hombre sano) por el peso ideal del sujeto (kg).

Para el cálculo del peso ideal (PI) se puede recurrir a diversas fórmulas:

- **Brocca:** $PI = A - 100$ ($A =$ altura en cm).
No establece diferencias por edad, complexión ni sexo.

- **Lorenz:** $PI = A - 100 - \frac{A - 150}{4} + \frac{E - 20}{K}$

K: Hombres = 4 y Mujeres = 2,5.
A: altura en cm. E = edad en años.

- **Metropolitan Life Insurance Company:**
 $PI = 50 + 0,75 (A - 150)$. $A =$ altura en cm
Tampoco establece diferencias por edad.

Cálculo de la excreción teórica de creatinina

A partir de la tabla P21-2 se puede estimar el valor teórico de creatinina urinaria, en función del sexo y la talla.

Cálculo de la masa muscular y masa magra corporal (MMC)

En el sujeto sano la excreción urinaria de creatinina se correlaciona con la masa muscular y la masa magra. Con el valor de creatinina total excretada en 24 h se puede calcular la masa muscular del paciente, sabiendo que en condiciones normales se excretan 50 mg de creatinina/kg de músculo/día.

También se puede obtener su masa magra o masa libre de grasa aplicando la fórmula:

$$MMC = 21,0 + 21,5 (\text{g creatinina orina } 24 \text{ h})$$

Tabla P21-2. VALORES ESTÁNDAR DE EXCRECIÓN DE CREATININA EN ORINA (24 HORAS) SEGÚN LA TALLA EN HOMBRES Y MUJERES

HOMBRE		MUJER	
Talla (cm)	Creatinina teórica (mg)	Talla (cm)	Creatinina teórica (mg)
157,5	1.288	147,8	830
160,0	1.325	149,9	851
162,6	1.359	152,4	900
165,1	1.386	154,9	908
167,6	1.426	157,5	925
170,2	1.467	160,0	949
172,7	1.513	162,6	977
175,3	1.555	165,1	1.006
177,8	1.596	167,6	1.044
180,3	1.642	170,2	1.076
182,9	1.691	172,7	1.109
185,4	1.739	175,3	1.141
188,0	1.785	177,8	1.174
190,5	1.831	180,3	1.206
193,0	1.891	182,9	1.240

BIBLIOGRAFÍA

- Barreto Penie J, Santana Porben S, Consuegra Silverio D (2003). Intervalos de referencia locales para la excreción urinaria de creatinina en una población adulta. *Nutr Hosp* 18:65-75.
- Hari P, Bagga A, Mahajan P, Lakshmy R (2007). Effect of malnutrition on serum creatinine and cystatin C levels. *Pediatr Nephrol* 22:1757-1761.
- Hernández M (1999). Valoración del estado de nutrición. En "Tratado de Nutrición". M. Hernández y A. Sastre (ed.). Díaz de Santos, Madrid.
- Planas Vilá M y Pérez Portabella Maristany C (2008). Evaluación clínica del estado nutricional. En "Nutrición y dietética clínica". J. Salas-Salvadó, A. Bonada i Sanjaume, R. Trallero Casaños, M. Saló i Solá (ed.). Elsevier-Masson, Barcelona.
- Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int>
- Russell MK (2004). Monitorización del laboratorio. En "Nutrición Clínica Práctica". L.E. Matarese, M.M. Gottschlich (ed.). Elsevier, Madrid.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



		Sujeto 1	Sujeto 2	Sujeto 3
Peso (kg)	Real			
	Ideal			
Talla (cm)				
Determinación de la creatinina	Concentración de creatinina en orina (mg/mL)			
	Excreción total de creatinina por día (mg)			
	IEC (%)			
Estado de nutrición (según IEC)				
Masa muscular (kg)				
Masa magra corporal (kg)				

COMENTARIOS



Empty space for comments.

Evaluación del crecimiento en la infancia y la adolescencia

I. Díez López, I. Labayen Goñi y V. M. Rodríguez Rivera

INTRODUCCIÓN

El crecimiento consiste en un aumento de la masa corporal que se acompaña de procesos madurativos y de cambios morfológicos que se prolonga hasta el final de la adolescencia, pero cuya velocidad o ritmo varía a lo largo del tiempo.

Así, se considera como etapa de crecimiento rápido aquella que incluye el período de lactancia y la edad maternal; la etapa de crecimiento estable que incluye la edad preescolar y escolar; y finalmente la de crecimiento acelerado, que corresponde a la adolescencia.

La evaluación del estado nutricional debe formar parte del examen rutinario del lactante y de los niños sanos y es una parte importante de la exploración clínica del niño enfermo. Es preciso aclarar que un estado nutritivo deficiente puede ser la causa o la consecuencia de enfermedad.

La antropometría se basa en la recogida y valoración de medidas corporales del niño que permite valorar la evolución del niño mediante el seguimiento de los cambios que van apareciendo a lo largo de los meses o años. La evaluación del crecimiento y del estado nutricional debe ser un procedimiento dinámico que considere especialmente datos longitudinales, que puedan compararse con valores de referencia fiables.

Las curvas y tablas de crecimiento que más se utilizan en la población española son las elaboradas por la Fundación Faustino Orbegozo (Sobradillo y cols., 2004), las de Carrascosa y colaboradores (2008) y las de la OMS (1986, 1987). El valor medio es el percentil 50 (P_{50}), es decir, que la mitad de los niños tiene un valor superior a la cifra que estamos obteniendo al medir el parámetro antropométrico (peso, talla, etc.) y la otra mitad tiene un

valor inferior. A través del parámetro estadístico “desviación estándar” se obtienen el resto de los percentiles (P_3 , P_{10} , P_{25} , P_{75} , P_{90} y P_{97}).

De este modo, un percentil 25 para un parámetro antropométrico concreto (por ejemplo, una talla de 73 cm en un niño de 12 meses) significa que, de toda la población, el 25% mide menos que ese niño (son los valores a la izquierda o inferiores del P_{25} en la curva de Gauss y, por tanto, el 75% tiene más altura (son los valores a la derecha o superiores del P_{25} en la curva de Gauss). Por el contrario, un P_{90} (por ejemplo, una talla de 78,5 cm en un niño de 12 meses) indica que el 90% de la población está por debajo de esa altura y solamente un 10% de la población estudiada era más alta que ese niño.

La normalidad viene expresada como aquellos valores que permanecen entre P_5 y P_{95} (de forma puntual) o como la ausencia de ganancia o pérdida de 1 o más carriles si es una sucesión de medidas.

OBJETIVOS

Los objetivos de la presente práctica son evaluar el crecimiento y el estado nutricional de un lactante, de un niño en edad escolar y de un adolescente.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Como se ha dicho previamente, la evaluación práctica del crecimiento y del estado nutricional

consisten en comparar los datos de cada niño en cuestión con datos existentes de una población infantil y con los datos previos del propio niño, y en hacer una interpretación de los mismos. Para ello recogemos a continuación algunos de los datos antropométricos e índices derivados más estudiados y sus interpretaciones correspondientes.

- **Peso:** se emplea para el cálculo de índices derivados.
- **Peso con respecto a la edad:** se evalúa con las curvas de percentiles (de 0 a 3 años, págs. 234 y 235; de 2 a 18 años, págs. 237 y 238) o con los valores de media y desviación estándar (de 0 a 3 años, pág. 236; de 2 a 18 años, pág. 243).
- **Longitud o talla:** se emplea para el cálculo de índices derivados.
- **Talla respecto a la edad:** se evalúa con las curvas de percentiles (de 0 a 3 años, págs. 234 y 235; de 2 a 18 años, págs. 239 y 240) o con los valores de la media y la desviación estándar (de 0 a 3 años, pág. 236; de 2 a 18 años, pág. 243).
- **Índice de masa corporal:** $IMC = \text{Peso (kg)}/\text{talla (m)}^2$. Se evalúa con las curvas de percentiles (págs. 241 y 242) o con los valores de media y desviación estándar (pág. 244).
- **Índice nutricional:** $IN = [(\text{Peso actual (kg)}/\text{Talla actual (m)}) / (\text{P}_{50} \text{Peso (kg)}/\text{P}_{50} \text{Talla (m)})] \times 100$. Se interpreta de acuerdo con los siguientes criterios: $> 120\%$ = obesidad; $110-120\%$ = sobrepeso; $90-110\%$ = normalidad; $90-85\%$ = desnutrición leve; $85-75\%$ = desnutrición moderada; $< 75\%$ = desnutrición severa.
- **Puntuación típica o valor Z-score** = $[(\text{dato} - \text{P}_{50} \text{del grupo patrón})/\text{desviación estándar}]$. Describe el número o fracción de desviaciones estándar por las que un sujeto se separa de la media.
- **Predicción de la talla final:** uno de los métodos empleados se basa en que la talla final depende en gran parte de factores hereditarios (Hernández Rodríguez, 1994):

$$\text{Chicos: TF} = [(T_{\text{padre}} + T_{\text{madre}}) + 13]/2$$

$$\text{Chicas: TF} = [(T_{\text{padre}} + T_{\text{madre}}) - 13]/2$$

Debido a la variabilidad individual en la edad de inicio de la pubertad, para valorar el estado nutricional del adolescente no es suficiente con conocer su edad real (edad cronológica), sino que es necesario conocer su edad biológica, que es la que se corresponde con su estado de desarrollo. Para conocer la edad biológica de un individuo puede em-

plearse el estudio del grado de desarrollo de sus genitales, a través de la clasificación de Tanner ([tablas pág. 245](#)).

Material y equipos

Equipos

- Báscula infantil.
- Báscula con tallímetro.
- Cinta métrica inelástica.
- Lipocalibre.

Material

- Curvas, nomogramas y tablas de referencia (Carrascosa y col., 2008; Sobradillo y col., 2004, OMS, 1986-1987).

Protocolo

1. Para la evaluación del crecimiento es necesario obtener un histórico con los datos de los que se ha hablado en el apartado "Fundamento" anterior: género, edad (meses o años), talla (cm), peso (kg). Puede representarse en una tabla como la siguiente:

Edad (meses)	0	1	2	4	6	8	10	12	14
Talla (cm)									
Peso (kg)									

2. En el caso de adolescentes se ha de emplear la edad biológica en lugar de la cronológica en todas las interpretaciones (talla, peso e IMC con respecto a edad), determinando el estadio puberal de acuerdo a los criterios de Tanner.
3. Por otra parte, para el cálculo de la talla final prevista de acuerdo a factores genéticos se deberán conocer la talla de cada uno de los progenitores.

Cálculos

Se introducen los datos correspondientes en los nomogramas y se realiza la representación gráfica de crecimiento uniendo los puntos.

Se ha de calcular el Z-score, para cada variable teniendo en cuenta edad y sexo.

BIBLIOGRAFÍA

Carrascosa A, Fernández JM, Fernández C, Ferrández A y López JP (2008). Estudio transversal español de crecimiento. *Anales de Pediatría* 68:552-569.

Hernández M (1994). Fisiología y valoración del crecimiento. *Pediatría* (2.ª ed.) Díaz de Santos, Madrid.

Sobradillo B, Aguirre A, Arcsti U, Bilbao A, Fernández-Ramos C, Lizárraga A, Lorenzo H, Madariaga L, Rica I, Ruiz I, Sánchez E, Santamaría C, Serrano JM, Zabala A, Zurimendi B y Hernández M (2004). Instituto sobre crecimiento y desarrollo. Fundación Faustino Orbeagozo Eizaguirre, Bilbao.

WHO (1987). Global surveillance through anthropometric measurements, Part I. *Weekly Epidemiological Record*. Nutrition 62:37-38.

WHO (1986). Use and interpretation of anthropometric indicators of nutritional status. WHO Working Group. *Bull WHO* 64:929-491.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



- Edad biológica (años):
- Grado de desarrollo (adelantado, adecuado o retardado):
- Evaluación de la talla:
- Evaluación del peso:
- Evaluación del peso respecto a la talla:

Diagnóstico

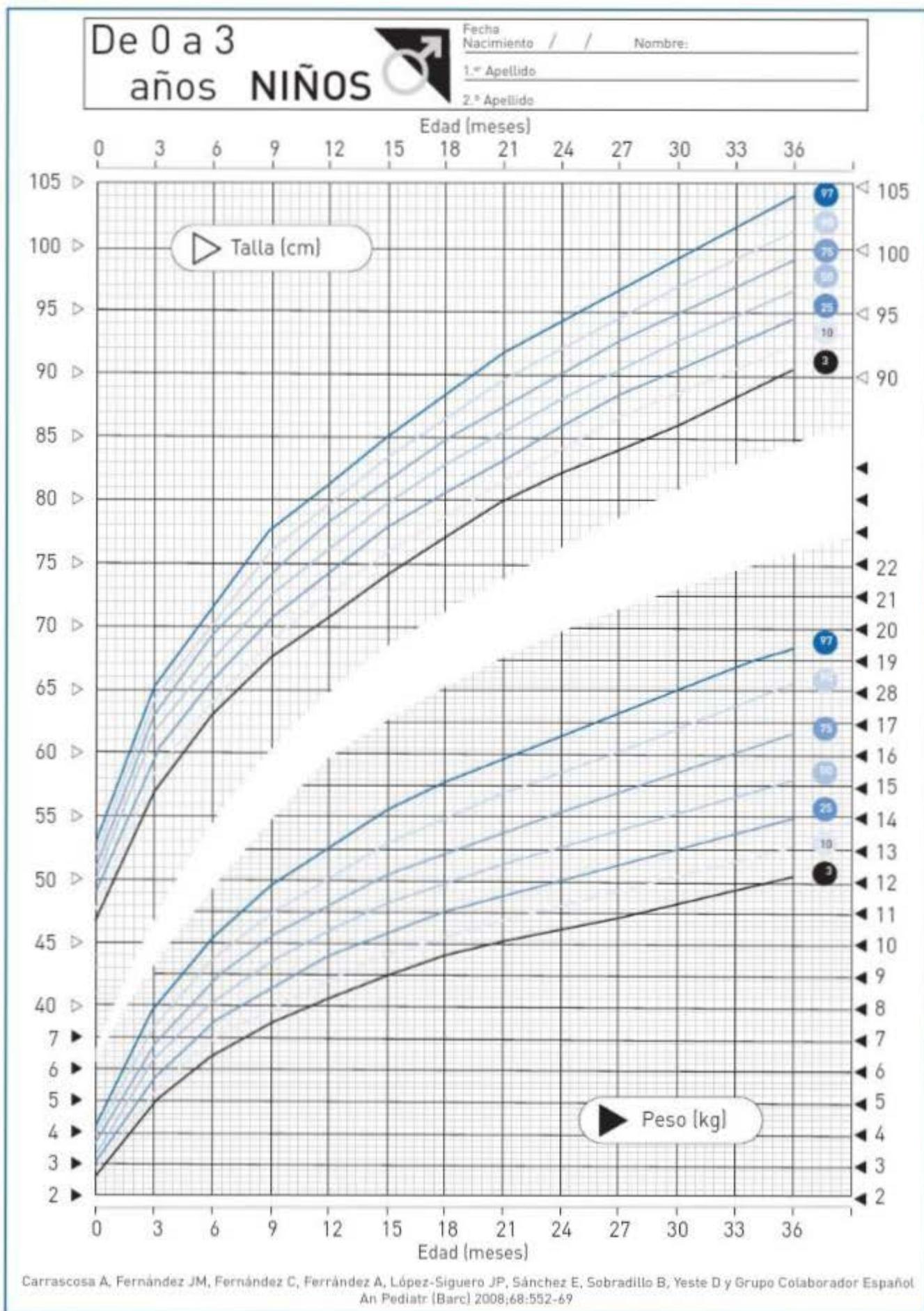
- Talla final prevista según factores hereditarios (cm):

COMENTARIOS



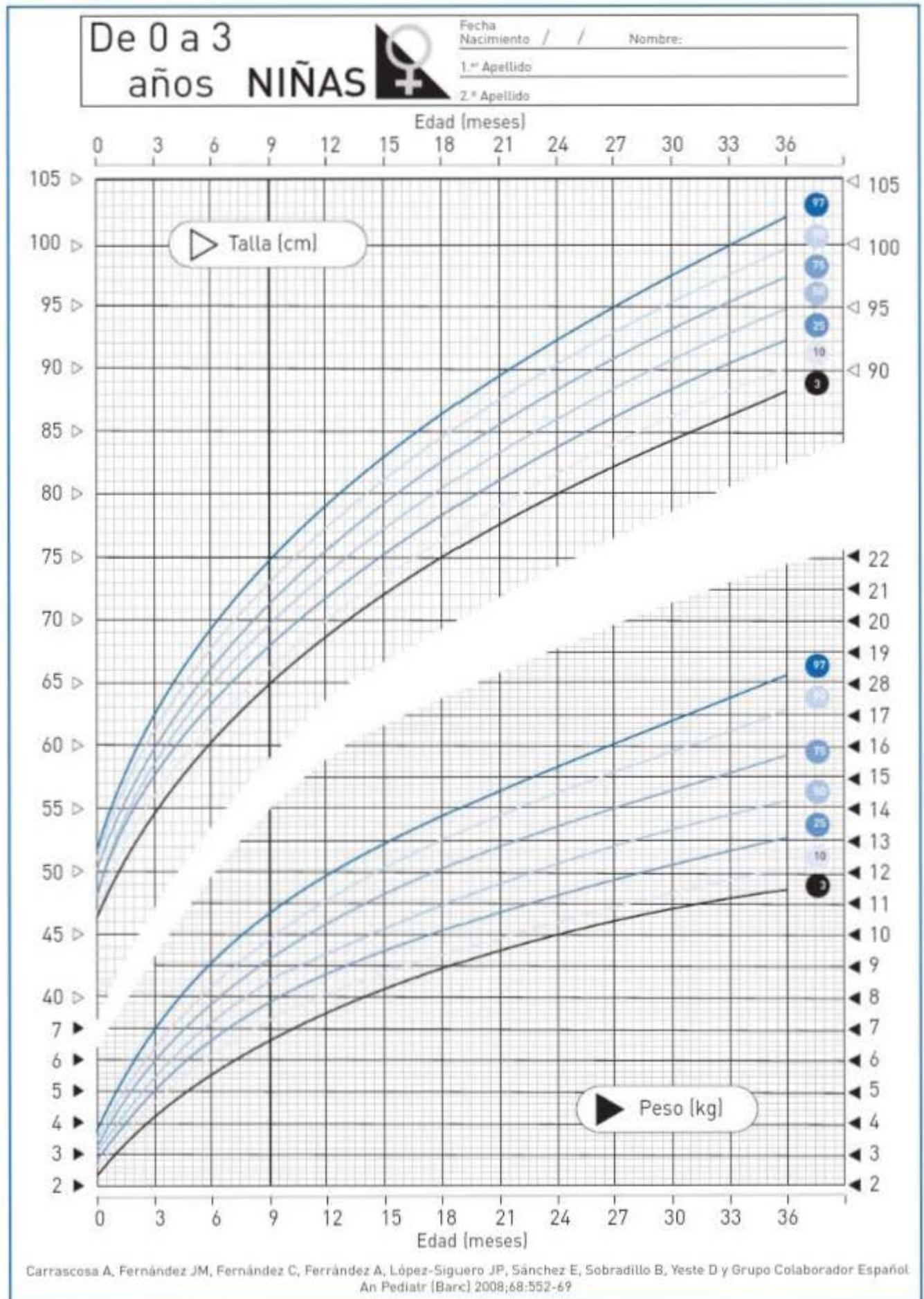
CURVAS Y TABLAS DE CRECIMIENTO

ANEXO 1



CURVAS Y TABLAS DE CRECIMIENTO

ANEXO 2.



ANEXO 3

Niños de 0 a 3 años



Valores de talla (cm)
expresados como Media y
Desviación Estándar (DE)

Valores de peso (kg)
expresados como Media y
Desviación Estándar (DE)

▶ Talla (cm)			
Edad en meses	Nº	Media	DE
0	2974	50,02	1,82
3	233	61,06	3,05
6	214	67,57	2,62
9	213	72,61	2,43
12	169	75,88	2,81
15	166	79,66	2,80
18	149	82,64	3,13
21	153	85,61	3,00
24	182	88,21	2,83
30	263	92,29	3,10
36	508	97,09	3,23

▶ Peso (Kg)			
Edad en meses	Nº	Media	DE
0	2974	3,31	0,43
3	233	6,25	0,90
6	214	8,10	1,09
9	213	9,32	1,13
12	169	10,37	1,12
15	166	11,22	1,40
18	149	12,08	1,45
21	153	12,59	1,34
24	182	12,90	1,42
30	263	14,14	1,60
36	508	15,40	2,00

Niñas de 0 a 3 años



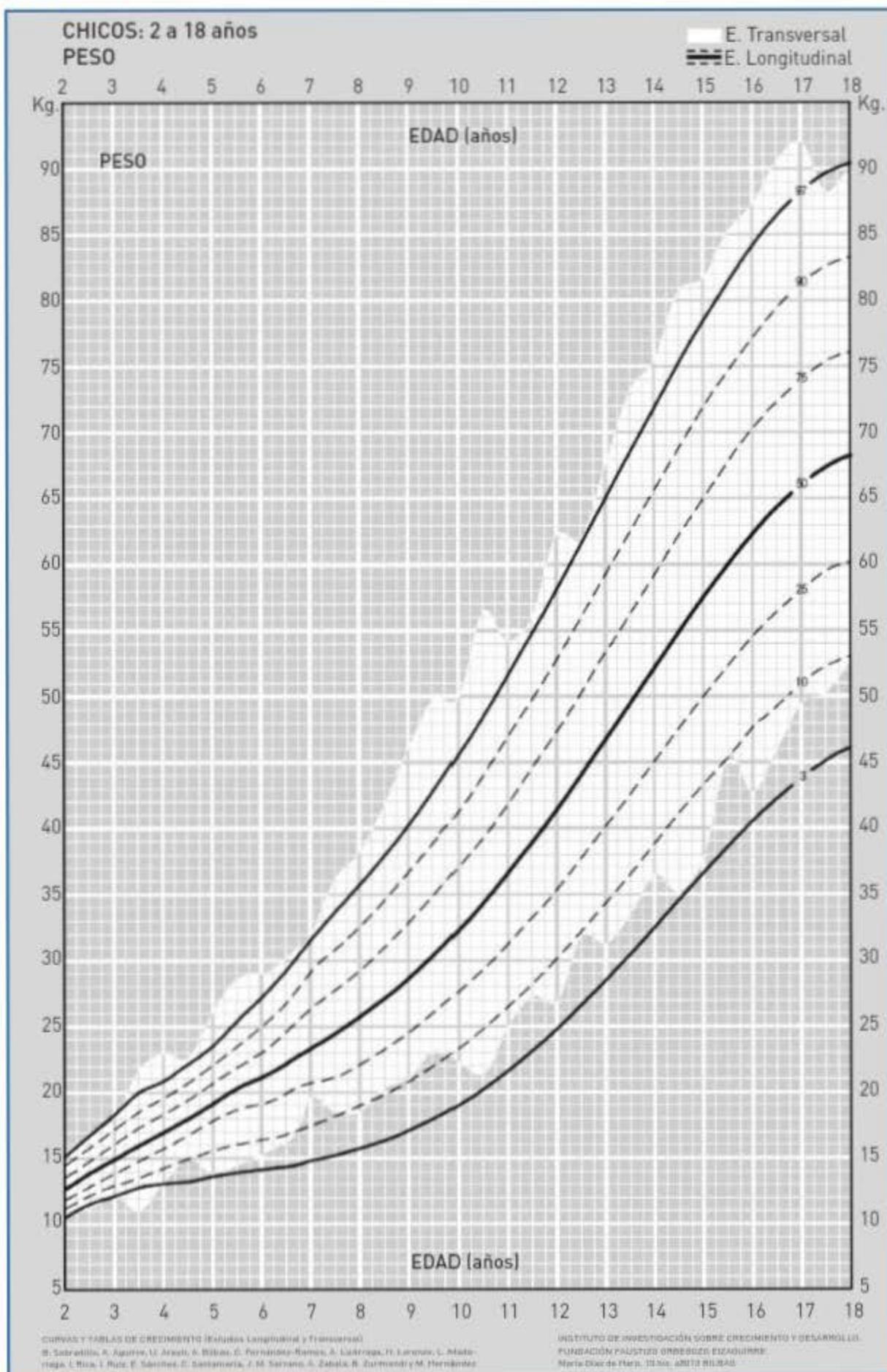
Valores de talla (cm)
expresados como Media y
Desviación Estándar (DE)

Valores de peso (kg)
expresados como Media y
Desviación Estándar (DE)

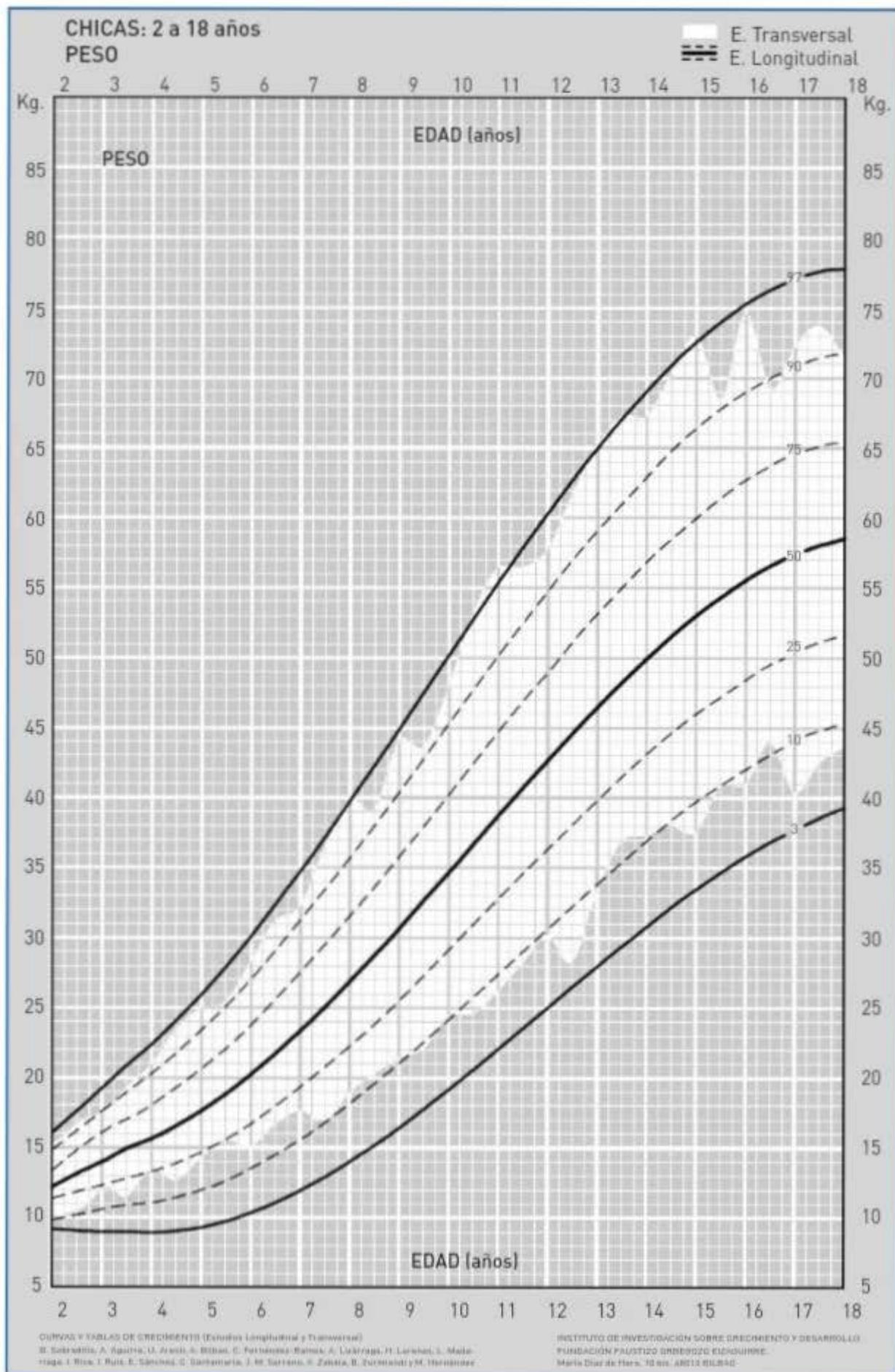
▶ Talla (cm)			
Edad en meses	Nº	Media	DE
0	2822	49,43	1,73
3	233	59,06	2,81
6	205	65,60	2,65
9	186	70,26	2,75
12	175	74,27	2,47
15	138	77,57	2,67
18	125	80,91	2,85
21	106	83,93	3,08
24	114	86,73	2,96
30	193	91,11	3,55
36	474	95,57	3,79

▶ Peso (Kg)			
Edad en meses	Nº	Media	DE
0	2822	3,18	0,41
3	233	5,64	0,80
6	205	7,40	0,92
9	186	8,71	1,15
12	175	9,73	1,08
15	138	10,32	1,14
18	125	11,12	1,30
21	106	11,82	1,31
24	114	12,49	1,40
30	193	13,61	1,52
36	474	14,55	1,68

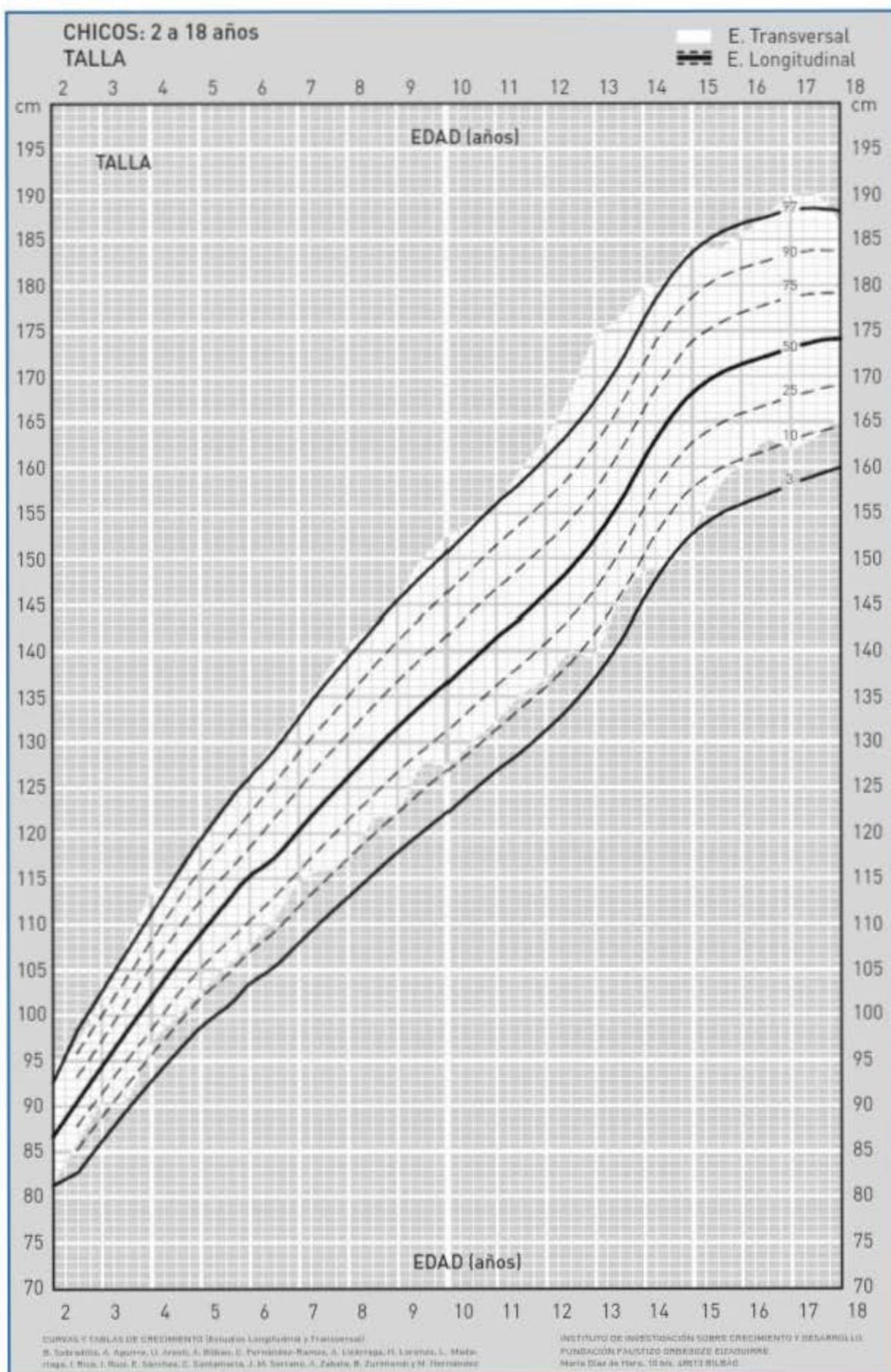
ANEXO 4



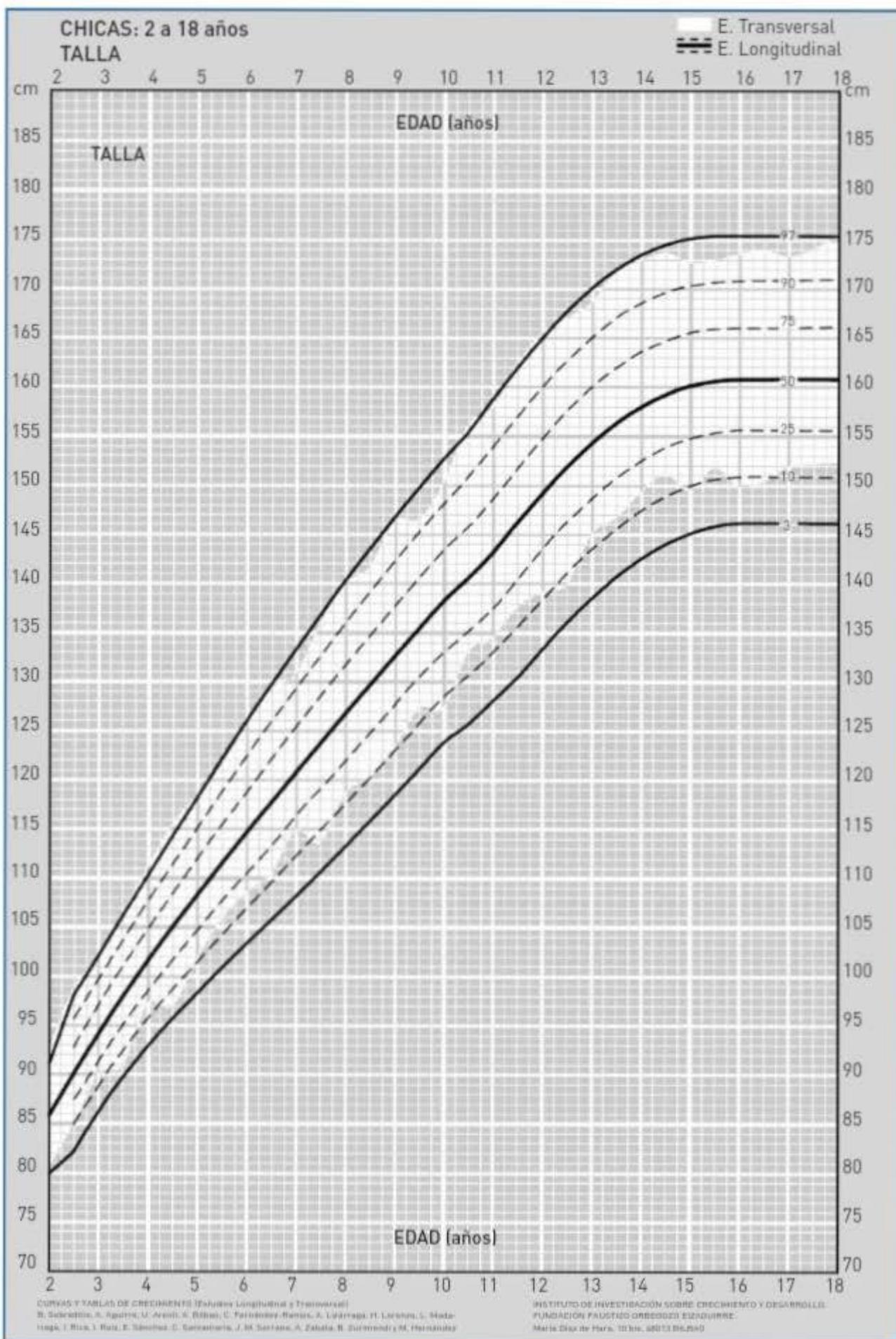
ANEXO 5



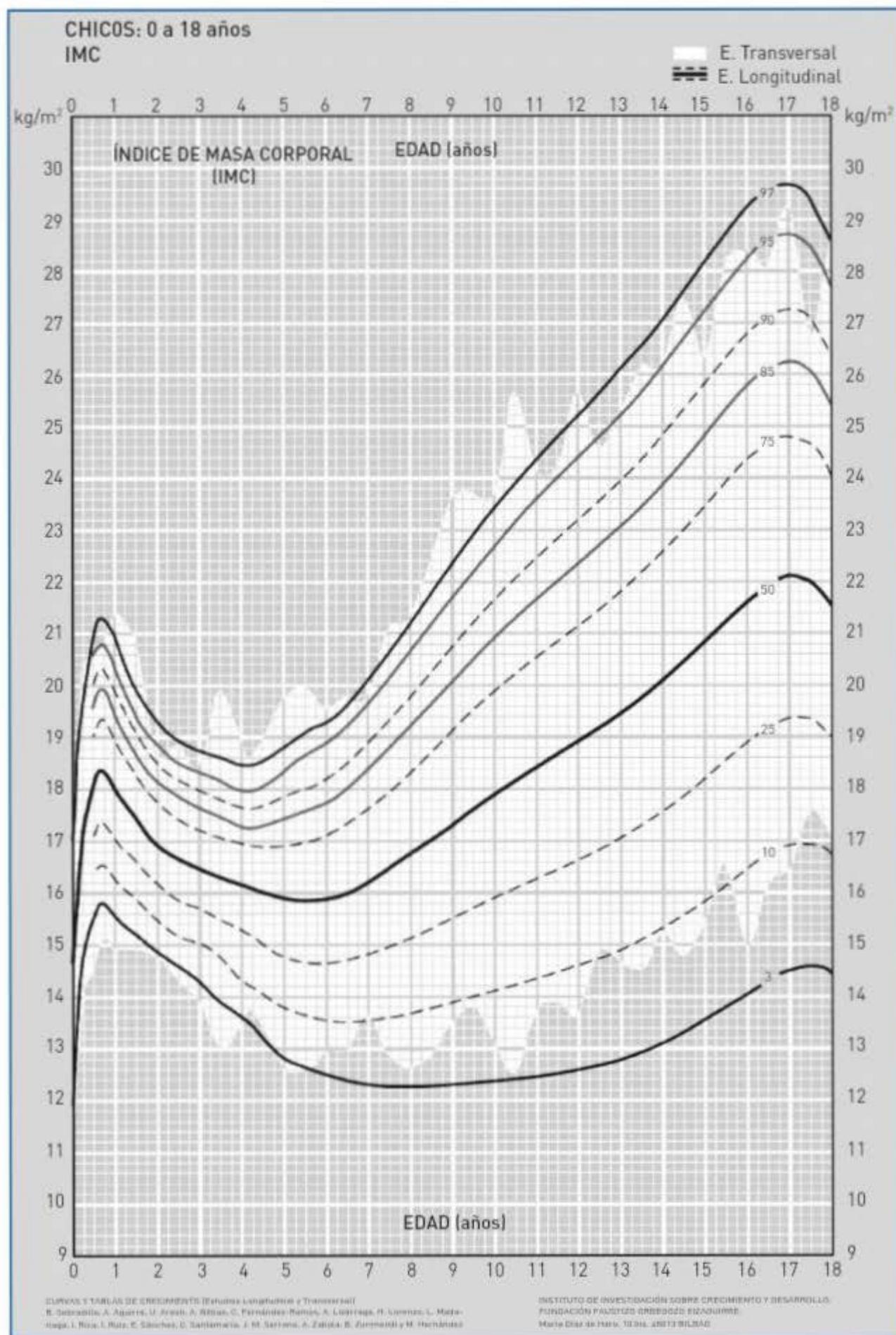
ANEXO 6



ANEXO 7



ANEXO 8



ANEXO 10

TRANSVERSAL CHICOS

	Longitud* Talla** (cm.)				Peso (Kg.)			
	P3	P50	P97	DS	P3	P50	P97	DS
Nac.	46,93	49,84	52,75	1,55	2,57	3,24	3,91	0,36
3 m.	55,43	61,08	66,73	3,00	4,77	6,23	7,69	0,78
6 m.	62,84	67,37	71,91	2,41	6,21	7,94	9,67	0,92
9 m.	67,07	72,09	77,10	2,67	7,24	9,33	11,43	1,11
1 a.	70,02	75,38	80,74	2,85	8,17	10,30	12,42	1,13
15 a.	76,76	82,35	87,94	2,97	9,58	12,12	14,65	1,35
2 a.	81,86	86,03	94,21	3,28	10,54	12,95	15,36	1,28
25 a.	86,46	91,83	97,21	2,86	11,19	14,02	16,84	1,50
3 a.	90,54	96,34	102,14	3,08	12,06	14,99	17,92	1,56
35 a.	91,08	99,35	107,62	4,40	11,02	16,34	21,66	2,83
4 a.	97,02	105,29	113,55	4,39	13,21	18,04	22,88	2,57
45 a.	99,96	107,47	114,98	3,99	14,87	18,69	22,52	2,03
5 a.	102,88	110,86	118,84	4,24	13,81	19,87	25,93	3,22
55 a.	106,05	114,75	123,44	4,62	14,45	21,50	28,55	3,75
6 a.	107,87	117,05	126,24	4,88	15,55	22,34	29,13	3,61
65 a.	110,84	120,34	129,83	5,05	16,86	23,83	30,80	3,71
7 a.	114,84	124,01	133,19	4,88	19,65	25,69	31,74	3,21
75 a.	116,14	126,57	137,01	5,55	18,44	27,27	36,10	4,69
8 a.	116,96	128,84	140,71	6,31	18,50	28,28	38,07	5,20
85 a.	121,54	132,09	142,63	5,61	20,26	30,97	41,67	5,69
9 a.	122,53	133,98	145,43	6,09	21,04	33,52	46,00	6,63
95 a.	127,60	138,77	149,94	5,94	23,12	36,39	49,65	7,05
10 a.	127,68	140,05	152,41	6,58	22,28	36,05	49,83	7,32
105 a.	130,24	142,07	153,90	6,29	21,33	38,85	56,37	9,31
11 a.	132,56	144,17	155,78	6,17	25,00	39,58	54,16	7,75
115 a.	135,29	147,49	159,68	6,48	27,28	41,61	55,93	7,62
12 a.	137,13	150,10	163,07	6,90	26,88	44,54	62,20	9,39
125 a.	140,01	153,95	167,90	7,42	31,89	46,87	61,85	7,96
13 a.	139,72	156,87	174,01	9,12	31,21	49,32	67,42	9,63
135 a.	145,48	160,97	176,46	8,23	33,43	53,27	73,12	10,55
14 a.	148,67	164,13	179,59	8,22	36,46	55,96	75,45	10,37
145 a.	149,21	165,04	180,86	8,41	35,16	57,95	80,73	12,11
15 a.	153,16	168,79	184,41	8,31	37,80	59,71	81,83	11,65
155 a.	157,92	170,94	183,96	6,92	45,47	65,36	85,24	10,57
16 a.	160,50	172,98	185,47	6,64	42,74	64,98	87,21	11,82
165 a.	163,02	175,32	187,62	6,54	46,02	68,27	90,53	11,83
17 a.	162,22	176,04	189,87	7,35	49,50	70,76	92,03	11,30
175 a.	163,36	176,69	190,03	7,09	50,25	69,25	88,25	10,10
18 a.	165,56	176,27	186,98	5,69	52,67	71,26	89,86	9,88

* Menores de 3 años

** A partir de 3 años

TRANSVERSAL CHICAS

	Longitud* Talla** (cm.)				Peso (Kg.)			
	P3	P50	P97	DS	P3	P50	P97	DS
Nac.	46,02	49,28	52,54	1,73	2,35	3,13	3,91	0,41
3 m.	54,30	59,24	64,19	2,63	4,35	5,70	7,05	0,72
6 m.	61,47	65,94	70,42	2,38	5,88	7,42	8,96	0,82
9 m.	65,63	70,59	75,56	2,64	6,72	8,83	10,93	1,12
1 a.	69,09	74,38	79,67	2,81	7,58	9,74	11,89	1,15
15 a.	75,43	81,18	86,93	3,06	8,80	11,30	13,80	1,33
2 a.	80,45	86,36	92,28	3,14	9,95	12,55	15,15	1,38
25 a.	84,81	91,73	98,64	3,68	10,64	13,75	16,87	1,66
3 a.	89,97	95,81	101,64	3,10	12,19	14,91	17,82	1,44
35 a.	90,75	98,50	106,25	4,12	11,48	15,36	19,25	2,07
4 a.	97,06	103,93	110,79	3,65	13,44	17,15	20,86	1,97
45 a.	96,78	106,05	115,33	4,93	12,68	18,01	23,34	2,84
5 añ.	101,70	109,97	118,25	4,40	14,23	19,57	24,91	2,84
55 a.	105,68	113,47	121,25	4,14	15,53	20,49	25,44	2,63
6 a.	108,41	116,99	125,57	4,56	15,10	21,66	28,22	3,49
65 a.	110,28	119,73	129,18	5,02	16,61	23,87	31,13	3,86
7 a.	114,79	122,69	130,60	4,20	17,68	24,94	32,20	3,86
75 a.	113,48	124,61	135,73	5,91	16,92	26,67	36,41	5,18
8 a.	118,58	129,21	139,85	5,65	18,89	29,36	39,83	5,57
85 a.	120,11	130,79	141,47	5,68	20,27	29,71	39,15	5,02
9 a.	123,17	134,71	146,26	6,14	21,39	32,73	44,07	6,03
95 a.	127,22	136,82	146,42	5,10	22,08	32,86	43,64	5,73
10 a.	127,33	138,73	150,14	6,06	24,35	36,11	47,88	6,26
105 a.	132,93	144,45	155,97	6,12	24,60	38,93	53,25	7,62
11 a.	134,46	146,13	157,79	6,20	26,15	41,29	56,42	8,04
115 a.	137,59	149,97	162,36	6,58	28,17	42,32	56,47	7,52
12 a.	139,04	152,25	165,45	7,02	30,24	44,00	57,76	7,31
125 a.	139,86	153,40	166,94	7,20	28,30	44,99	61,69	8,88
13 a.	144,99	156,74	168,50	6,25	33,31	49,21	65,11	8,45
135 a.	146,64	159,13	171,61	6,64	36,93	52,13	67,32	8,08
14 a.	149,27	161,03	172,79	6,25	37,34	52,32	67,30	7,96
145 a.	151,13	162,35	173,58	5,97	37,99	54,14	70,30	8,59
15 a.	149,43	161,00	172,57	6,15	37,57	55,29	73,01	9,42
155 a.	151,74	162,28	172,82	5,60	40,91	54,69	68,48	7,33
16 a.	149,88	161,68	173,49	6,28	40,99	57,84	74,68	8,96
165 a.	150,37	162,14	173,92	6,26	44,01	56,62	69,24	6,70
17 a.	151,90	162,56	173,21	5,67	40,41	56,35	72,29	8,47
175 a.	152,18	163,04	173,91	5,78	42,54	58,16	73,78	8,30
18 a.	152,23	163,83	175,42	6,17	43,66	57,57	71,48	7,40

* Menores de 3 años

** A partir de 3 años

ANEXO 11

Indice de masa corporal Peso/Talla ² (Kg. /m. ²)						Indice de masa corporal Peso/Talla ² (Kg. /m. ²)					
P3	P50	P85	P95	P97	DS	P3	P50	P85	P95	P97	DS
11,30	13,00	13,94	14,50	14,71	0,91	10,68	12,84	14,03	14,73	15,00	1,15
14,00	16,67	18,14	19,01	19,33	1,42	13,68	16,20	17,59	18,40	18,72	1,34
14,48	17,52	19,20	20,19	20,56	1,62	14,46	17,03	18,45	19,28	19,60	1,37
15,15	17,92	19,44	20,34	20,68	1,47	14,96	17,66	19,15	20,03	20,36	1,44
14,91	18,12	19,89	20,93	21,33	1,71	14,22	17,62	19,50	20,60	21,02	1,81
14,90	17,85	19,48	20,43	20,81	1,57	14,45	17,13	18,61	19,48	19,82	1,43
14,79	16,71	17,70	18,39	18,64	1,02	14,61	16,79	17,99	18,70	18,98	1,16
14,32	16,59	17,83	18,56	18,85	1,20	13,91	16,30	17,62	18,39	18,68	1,27
13,89	16,12	17,35	18,08	18,36	1,19	14,19	16,28	17,43	18,11	18,37	1,11
13,01	16,46	18,36	19,47	19,92	1,83	13,12	15,79	17,26	18,13	18,46	1,42
13,48	16,22	17,73	18,62	18,96	1,46	13,25	15,85	17,29	18,14	18,46	1,39
13,73	16,16	17,50	18,28	18,60	1,29	12,79	15,94	17,68	18,70	19,10	1,68
12,68	16,19	18,12	19,25	19,70	1,86	13,11	16,12	17,78	18,75	19,12	1,60
12,53	16,26	18,31	19,52	19,99	1,98	12,66	15,90	17,68	18,73	19,14	1,72
12,93	16,23	18,04	19,11	19,53	1,75	12,27	15,75	17,67	18,79	19,24	1,85
12,96	16,37	18,25	19,35	19,77	1,81	12,83	16,55	18,60	19,81	20,27	1,98
13,66	16,68	18,35	19,33	19,70	1,61	12,77	16,51	18,56	19,77	20,24	1,98
12,85	16,97	19,24	20,57	21,09	2,19	12,38	17,07	19,66	21,18	21,77	2,50
12,62	16,96	19,35	20,76	21,30	2,31	12,87	17,48	20,02	21,51	22,09	2,45
12,92	17,69	20,32	21,87	22,47	2,54	13,30	17,32	19,54	20,84	21,33	2,14
13,50	18,54	21,32	22,95	23,59	2,68	13,81	17,91	20,17	21,50	22,00	2,18
13,82	18,77	21,50	23,10	23,72	2,63	12,51	17,51	20,27	21,89	22,50	2,66
13,08	18,34	21,24	22,95	23,61	2,80	14,24	18,67	21,12	22,55	23,11	2,36
12,50	19,08	22,70	24,82	25,65	3,49	13,17	18,57	21,54	23,29	23,97	2,87
13,71	18,93	21,80	23,49	24,14	2,77	13,70	19,23	22,28	24,07	24,76	2,94
13,88	19,04	21,89	23,56	24,21	2,75	14,07	18,71	21,27	22,77	23,35	2,47
13,65	19,64	22,95	24,89	25,64	3,19	14,30	18,91	21,45	22,94	23,51	2,45
14,89	19,71	22,36	23,92	24,53	2,56	13,61	19,02	21,99	23,74	24,42	2,87
14,65	19,98	22,92	24,65	25,31	2,84	14,71	19,96	22,85	24,55	25,21	2,79
14,50	20,32	23,52	25,40	26,14	3,09	15,46	20,55	23,35	24,99	25,64	2,70
15,22	20,67	23,66	25,42	26,11	2,89	15,08	20,15	22,94	24,58	25,22	2,69
14,76	21,12	24,62	26,68	27,48	3,38	14,96	20,52	23,59	25,39	26,09	2,96
15,46	20,89	23,88	25,64	26,32	2,89	15,35	21,29	24,56	26,49	27,24	3,16
16,51	22,33	25,53	27,41	28,14	3,09	16,32	20,75	23,19	24,62	25,18	2,35
14,94	21,68	25,39	27,57	28,42	3,58	17,18	22,06	24,74	26,32	26,94	2,59
16,17	22,13	25,41	27,35	28,10	3,17	16,88	21,56	24,14	25,66	26,24	2,49
16,44	22,83	26,35	28,42	29,22	3,40	15,91	21,32	24,30	26,06	26,73	2,88
17,53	22,13	24,66	26,14	26,72	2,44	16,06	21,89	25,10	26,99	27,73	3,10
17,08	22,94	26,16	28,06	28,80	3,11	16,75	21,45	24,04	25,56	26,15	2,50

ANEXO 12

ESTADÍOS DE TANNER	
Niñas	Niños
Mama 1. Pre-adolescente. Sólo existe elevación del pezón.	Genital 1. (Pre-adolescente). Los testículos, escroto y pene son casi del mismo tamaño y forma que en la primera infancia.
Mama 2. Etapa del botón mamario. Crecimiento de la glándula, sin sobrepasar la areola, a la cual se levanta.	Genital 2. El escroto y los testículos aumentan ligeramente de tamaño. La piel del escroto se ha enrojecido y se ha modificado su textura. En este período el aumento del pene es escaso o no existe.
Mama 3. Hay mayor desarrollo de mama y areola pero sin separación de sus contornos. Se inicia el crecimiento del pezón.	Genital 3. Testículos y escroto más desarrollados que en el período 2. El pene ha aumentado ligeramente, sobre todo en longitud.
Mama 4. Crecimiento de la areola y del pezón, apareciendo tres contornos.	Genital 4. Pene más agrandado, aumento del diámetro y desarrollo del glande. Los testículos y el escroto están más desarrollados que en el período anterior y la piel escrotal es más oscura.
Mama 5. Mama adulta. Sólo es prominente el pezón, la areola retirada al contorno general de la mama.	Período 5. Los genitales tienen el tamaño y forma de las del adulto.

TABLAS DE CORRESPONDENCIA ENTRE TANNER Y EDAD BIOLÓGICA	
Estadio de Tanner	Edad biológica (años)
Niñas	
Mama 1	< de 10 años y seis meses
Mama 2	10 años y seis meses
Mama 3	11 años
Mama 4; aún sin menarquia	12 años
Menarquia	12 años 8 meses
Post menarquia	12 años 8 meses, más el tiempo transcurrido desde la menarquia
Niños	
Genitales 1	< de 12 años
Genitales 2	12 años
Genitales 3	12 años y seis meses
Genitales 4	13 años y seis meses
Genitales 5	14 años y 6 meses



COMENTARIOS

A large, empty rectangular area with a light blue gradient background, intended for users to enter their comments or notes.

Composición corporal

*M. Hernández Ruiz de Eguilaz, B. Martínez de Morentin Aldabe,
S. Pérez-Diez, J. A. Martínez Hernández*

INTRODUCCIÓN

El estudio de la composición corporal es un aspecto muy importante en la valoración del estado nutricional, ya que la distribución de la masa grasa y la masa magra en un individuo puede ayudar a detectar y corregir problemas nutricionales como la obesidad o la desnutrición. A través del estudio de la composición corporal, se puede juzgar y valorar de forma indirecta el efecto de la ingesta de energía y los diferentes nutrientes, el crecimiento o la actividad física.

Uno de los métodos más habituales para el estudio de la composición corporal es la medida de los pliegues cutáneos, que es un método indirecto de estimación de la grasa corporal. Uno de los principales inconvenientes de la medida de pliegues cutáneos es la variabilidad de la medida según el profesional que la realice, además de existir dificultad para coger grandes pliegues e incluso la insuficiente apertura del plicómetro en algunos casos. Además, este método mide únicamente la grasa subcutánea y no estima la grasa visceral.

Otros métodos para medir composición corporal son la impedancia bioeléctrica (BIA) y la absorciometría dual de rayos X (DEXA), que son técnicas empleadas fundamentalmente en la práctica clínica y también en investigación.

OBJETIVO

El objetivo de la práctica es evaluar los resultados obtenidos a través de diferentes métodos de análisis de la composición corporal: pliegues cutáneos, impedancia bioeléctrica y absorciometría dual de rayos X.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

La composición corporal en esta práctica se va a determinar mediante tres métodos, siendo los dos primeros de uso común en la práctica clínica, mientras que el tercero, la absorciometría dual de rayos X, es una medida más costosa y se utiliza fundamentalmente en investigación.

En relación a la medida de pliegues cutáneos, lo que se pretende es determinar la cantidad de tejido adiposo subcutáneo presente en el organismo. Los principales pliegues cutáneos se localizan en:

- **Bíceps:** situado en la parte anterior del miembro superior dominante, en el punto medio entre el acromion y el olécranon, de forma paralela al eje del brazo.
- **Tríceps:** en el mismo punto que el bíceps pero en la cara posterior del brazo. La medida de este pliegue es el método más utilizado como medidor de grasa corporal.
- **Subescapular:** justo por debajo de la punta de la escápula, con un eje de 45° respecto de la columna vertebral.
- **Suprailíaco:** por encima de la cresta ilíaca a nivel de la línea medio-axilar, formando un ángulo de 45° con la línea inguinal media.

La impedancia bioeléctrica es un método indirecto de valoración de composición corporal. Encontramos su fundamento en el comportamiento del organismo ante el paso de una corriente alterna, a una frecuencia (suele ser 50 kHz) o a varias. Hay que tener en cuenta que la grasa presenta una elevada resistencia al paso de la corriente, mientras que la masa muscular, por el con-

trario, ofrece muy poca resistencia. Los equipos suelen ir acompañados de un software para la obtención de los valores de masa grasa, masa magra, masa libre de grasa y agua total.

Estos métodos se han desarrollado mucho en los últimos años, ya que son aparatos sencillos, no muy caros y de fácil manejo y transporte. Además de los que tienen los electrodos sueltos y se colocan en el paciente con autoadhesivos, existen otros aparatos que incorporan los electrodos en elementos metálicos y se sujetan con ambas manos o se disponen en la superficie de una báscula donde se colocan los pies.

Este tipo de aparatos pueden ser bipolares o tetrapolares en función del número de electrodos que dispongan.

La absorciometría con rayos X de doble energía (DEXA) se diseñó inicialmente para el estudio de la masa ósea, pero permite valorar de forma precisa la masa grasa y la masa libre de grasa, irradiando muy levemente al individuo durante unos 7 minutos. Aunque su precio es de varios miles de euros, su coste se ha reducido en los últimos años, lo que ha permitido que su uso se difunda con rapidez y que la DEXA se haya convertido en una técnica de referencia.

La DEXA estudia la composición corporal desde un punto de vista de tres compartimentos que se distinguen por sus diferentes capacidades de atenuación de los rayos X: masa grasa (MG), masa ósea (MO) y MLG o masa magra; los componentes óseo y graso presentan la atenuación más alta y más baja, respectivamente, mientras que el componente tisular blando presentaría una atenuación intermedia.

Material

- Lipocalibre o compás de pliegues cutáneos.
- Bioimpedancia eléctrica bipolar y tetrapolar.
- Aparato de absorciometría dual de rayos X (DEXA).

Protocolo

Pliegues cutáneos

Para su determinación, en primer lugar debe localizarse el punto anatómico correspondiente a

cada pliegue y marcarse con un lápiz dermatográfico. El medidor deberá atrapar firmemente con el dedo índice y pulgar las dos capas de piel y tejido adiposo subcutáneo, manteniendo siempre el pliómetro perpendicular al pliegue. Siempre debe comprobarse que en la toma del pliegue no se ha atrapado masa muscular, indicando al paciente que contraiga los músculos de la zona cuando se ha cogido el pliegue. Una vez comprobado que no se ha cogido músculo, el paciente debe relajar de nuevo la musculatura para realizar la toma. El pliómetro se aplicará a un centímetro de distancia de los dedos que toman el pliegue, el cual se mantendrá atrapado durante toda la toma y la lectura se realizará cuando el descenso de la aguja del mismo se enlentece.

Para obtener una medida fiable, debe realizarse por triplicado y posteriormente calcular la media.

Para la determinación del porcentaje de grasa total, se calcula la densidad corporal del organismo en función de la edad y del resultado obtenido tras la suma de los cuatro pliegues cutáneos. La ecuación de densidad de Durnin y Womersley (1974) y la ecuación de Siri (1961) son las más utilizadas:

Varones de 17 a 72 años:

$$\begin{aligned} \text{Densidad} &= 1,1765 - [0,0744 \times \log (\text{BI} + \text{TR} + \text{SB} + \text{SI})] \\ \text{Densidad} &= 1,1143 - [0,0618 \times \log (\text{TR})] \end{aligned}$$

Mujeres de 16 a 68 años:

$$\begin{aligned} \text{Densidad} &= 1,1567 - [0,0717 \times \log (\text{BI} + \text{TR} + \text{SB} + \text{SI})] \\ \text{Densidad} &= 1,1278 - [0,0775 \times \log (\text{TR})] \end{aligned}$$

BI = bicipital; TR = tricípital; SB = subescapular; SI = suprailíaco

Individuos de 16 a 50 años:

$$\% \text{ de masa grasa} = [(4,95/d) - 4,5] \times 100$$

d = densidad

Impedancia bioeléctrica

La impedancia eléctrica bipolar consiste en una báscula la cual dispone de los electrodos colocados como elementos metálicos en su superficie. El paciente debe estar descalzo y colocar cada

pie encima de cada uno de los electrodos. Previamente es necesario introducir el sexo, la complejión, la edad y la talla del sujeto a medir y la báscula estima directamente el porcentaje de grasa.

La impedancia eléctrica tetrapolar requiere que el individuo se coloque en posición de decúbito supino y con los brazos y piernas ligeramente separados. Se colocan cuatro electrodos, dos receptores y dos emisores, en la mano y pie derechos. Al igual que en la impedancia bipolar, se introducen los datos del paciente y el aparato calcula directamente el porcentaje de grasa.

Puede haber diferencias importantes en cuanto a resultados, dependiendo del tipo de aparato que se utilice para las mediciones. También puede influir en los resultados el estado de hidratación del paciente, así como la distribución de la grasa que tenga el mismo.

Absorciometría dual de rayos X (DEXA)

El equipo de exploración de DEXA consiste en una mesa donde el sujeto permanece en decúbito supino, con las extremidades colocadas a lo largo del cuerpo, y que dispone de un brazo móvil en sentido cráneo-caudal y lateral donde está situada la fuente de rayos X que realiza el barrido del cuerpo y el detector de la radiación emergente tras atravesar el organismo. La fuente emite un

haz de rayos X de intensidad inicial variable según el modelo de equipo de DEXA utilizado.

BIBLIOGRAFÍA

- Bellido D, Carreira J (2008). Análisis por absorciometría de rayos X de doble energía y composición corporal. *Nutrición Clínica en Medicina* 2 (2),85-108.
- Durnin JVGA, Womersley J (1974). Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481, men and women aged from 16 to 72 years. *British Journal of Nutrition* 32,77-97.
- Marrodán MD, Santos MG, Mesa, MS, Cabañas MD, González-Montero de Espinosa M, Pacheco del Cerro JL (2007). Técnicas analíticas en el estudio de la composición corporal. *Antropometría frente a sistemas de bioimpedancia bipolar y tetrapolar. Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 27(1),11-19.
- Hernández M, Martínez de Morentin B, Pérez-Diez S, Navas-Carretero S, Martínez JA (2010). Estudio comparativo de composición corporal por absorciometría dual de rayos X, bioimpedancia y pliegues cutáneos en mujeres. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 76(2), 209-222.
- Siri WE (1961). Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. En "Techniques for measuring body composition" (pp.223-44). J. Brozek, A. Henschel (eds.). Washington DC: National Academy of Sciences. Natural Resources Council.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Medidas antropométricas: peso, talla, IMC y pliegues

Antropometría	1	2	3	Media
Peso (kg)				
Altura (m)				
IMC (kg/m ²)				
Pliegue tricipital (mm)				
Pliegue bicipital (mm)				
Pliegue subescapular (mm)				
Pliegue suprailíaco (mm)				

Composición corporal según las mediciones de los pliegues cutáneos

% Masa grasa	
% Masa magra	
% Agua	
Área muscular del brazo	
Área adiposa del brazo	

Composición corporal según aparato de bioimpedancia (BIA) y aparato de densitometría dual de rayos X (DEXA)

Composición corporal	Tanita	DEXA
Masa grasa (%)		
Masa grasa (kg)		
Masa magra (%)		
Masa magra (kg)		
Masa libre de grasa (kg)		
Agua total (%)		
Agua total (kg)		

Cuestionario de valoración del estado de hidratación del paciente, previo a la medida de impedancia

- ¿Ha tomado alcohol en las últimas 24 horas?
- ¿Ha realizado algún deporte o tomado una sauna en las últimas 12 horas?
- ¿Ha tomado café en las últimas 4 horas?
- ¿Ha comido en las últimas 2-3 horas?
- ¿Ha tomado importantes cantidades de líquidos en las últimas 2-3 horas?
- ¿Ha orinado en los últimos 30 minutos?

**COMENTARIOS**

Intolerancia a hidratos de carbono

M. C. Mugueta Uriaque y N. Varo Cenarruzabeitia

INTRODUCCIÓN

Los hidratos de carbono se encuentran en la dieta en forma de mono, di y polisacáridos. A nivel intestinal sólo se absorben los monosacáridos por lo que el resto debe sufrir procesos digestivos previos.

La intolerancia a hidratos de carbono se debe a la deficiencia de las enzimas hidrolíticas del borde en cepillo del enterocito, a la alteración del transporte activo de monosacáridos o a su metabolismo en circulación. Las causas pueden ser primarias por anomalía constitucional de las enzimas o secundarias a otras alteraciones intestinales como gastroenteritis, enfermedad de Crohn o celiacía.

OBJETIVO

Se pretenden valorar las principales intolerancias a hidratos de carbono: lactosa, fructosa/sorbitol y galactosa, basándose en la ingesta del azúcar y determinaciones de distintos parámetros pre y postestímulo en sangre, aliento y orina.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

El estudio analítico de la malabsorción de hidratos de carbono incluye análisis en diversas muestras biológicas tras la ingesta del azúcar. Las pruebas de aliento presentan las mejores prestaciones analíticas, tanto de sensibilidad como de especificidad. Se basan en la detección del hidrógeno generado en el colon por la fermentación

bacteriana de los azúcares no digeridos, ya que suponen la única fuente de hidrógeno en el organismo. El hidrógeno producido difunde a la sangre y se elimina por la respiración, detectándose en el aliento mediante equipos portátiles con sensores electroquímicos o equipos de sobremesa basados en cromatografía de gases.

La lactosa es un disacárido presente en la leche y sus derivados. La enzima lactasa, localizada en las células epiteliales del intestino delgado, hidroliza la lactosa en sus monosacáridos constituyentes, glucosa y galactosa, que pasan rápidamente a sangre.

La intolerancia se debe al déficit de lactasa, por lo que la lactosa no se digiere y continúa el tránsito intestinal generando una fuerza osmótica que atrae líquido. Cuando llega al colon, bacterias de la flora la fermentan formando ácidos y gases, como hidrógeno y metano. Esto provoca los síntomas intestinales característicos del cuadro: dolor abdominal, flatulencia y diarrea. Pero la intolerancia también puede producir debilidad, pérdida de concentración, dolores de cabeza, alergias e incluso arritmias.

La fructosa es un monosacárido que forma parte, junto a la glucosa, de la sacarosa o azúcar de mesa. Alimentos como la miel y las frutas también son ricos en fructosa. La forma común de intolerancia a la fructosa se debe a un fallo de la proteína que la transporta desde el intestino delgado hasta la sangre. Al no absorberse, alcanza el intestino grueso donde, al igual que la lactosa, es metabolizada por las bacterias de la flora produciendo ácidos y gases, entre ellos hidrógeno, responsables de los síntomas intestinales.

El sorbitol es un azúcar presente en zumos y frutas, y además se utiliza ampliamente como

edulcorante alimenticio por ser bajo en calorías. Una vez ingerido se absorbe parcialmente y en circulación se metaboliza a fructosa. La ingesta conjunta de sorbitol y fructosa parece potenciar la malabsorción de fructosa.

La galactosa es un monosacárido que se ingiere habitualmente en la dieta, sobre todo en forma de lactosa. Una vez absorbida en intestino, la galactosa se transforma en glucosa mediante tres reacciones enzimáticas. La intolerancia se debe al déficit genético de alguna de las enzimas que intervienen en su metabolismo, lo que provoca un aumento de la concentración de galactosa en sangre y orina. La galactosa es un azúcar reductor por lo que, tras su ingesta, se produce un resultado positivo en la reacción de Benedict en orina, previa confirmación de que en la muestra no hay glucosa. Por el contrario, no reacciona con la glucosa oxidasa, que es una enzima específica de la glucosa.

Material y equipos

Muestras

- Sangre, aliento y orina.

Equipos

- Espectrofotómetro de absorción visible - UV.
- Detector de hidrógeno.
- Baño maría.

Material

Intolerancia a la lactosa

- Lactosa.
- Agua/agua destilada.

Intolerancia a fructosa y sorbitol

- Fructosa.
- Sorbitol.
- Agua/agua destilada.

Intolerancia a la galactosa

- Galactosa.
- Agua/agua destilada.

Reactivos

Intolerancia a la lactosa

- Reactivo para determinar glucosa en sangre. Para preparar el reactivo de trabajo (RT), disolver un vial que contenga las enzimas con otro que contenga el tampón. Tapar el vial y mezclar suavemente hasta la completa disolución. Permanece estable durante 1 mes a 4 °C o 7 días a temperatura ambiente. El calibrador está listo para su uso y permanece estable durante 1 mes en nevera y protegido de la luz.

Intolerancia a la galactosa

- Tiras reactivas para determinar glucosa en orina.
- D(+) glucosa anhidra. Para preparar el control positivo, pesar 0,15 gramos de D(+) glucosa anhidra y disolverlos en 2,5 mL de agua destilada.
- Reactivo de Benedict para determinar azúcares reductores. Para prepararlo, disolver en caliente 17,3 g de sulfato de cobre pentahidratado en 100 mL de agua destilada. Por otro lado, disolver en caliente 173 g de citrato de sodio y posteriormente 100 g de carbonato de sodio en 800 mL de agua destilada. Enfriar. Añadir la solución de citrato-carbonato, agitando, a la del sulfato de cobre. Enrasar a 1 L con agua destilada. Este reactivo permanece estable hasta tres años a temperatura ambiente.

Protocolo

Intolerancia a la lactosa

1. La prueba para confirmar la intolerancia se basa en la ingesta por vía oral de 25 g de lactosa (equivalente a medio litro de leche) disueltos en agua y la toma de muestras de sangre y aliento antes y después del estímulo. Esta prueba puede realizarse igualmente en pacientes pediátricos tomando 1 g de lactosa por kg de peso, hasta un máximo de 25 g. En las muestras de sangre se determina la concentración de glucosa y en el aliento la cantidad de hidrógeno, en partes por millón (ppm).

- Para la realización de la prueba, el paciente debe permanecer en ayunas y sin fumar; además el día anterior tiene que evitar la ingesta de alimentos que contengan fructosa, sorbitol, fibra o comida de digestión lenta, ya que modifican el valor basal de hidrógeno en el aire espirado.
- La prueba se inicia cuando el paciente sopla en el detector de hidrógeno y se le extrae una muestra de sangre basal. Tras la ingesta de lactosa se realizan nuevas extracciones de sangre cada 30 minutos durante 2 horas y mediciones en el aliento cada 30 minutos durante 3 horas. Mientras dura la prueba y hasta 8 horas después, se observa la aparición de síntomas como malestar y dolor abdominal.
- Inmediatamente después de cada extracción de sangre, se centrifuga la muestra y se separa el suero.
- Para medir la concentración de glucosa presente en cada una de las muestras de suero se procede de la siguiente manera:
 - Preparar un tubo de ensayo para el blanco de reactivo, un tubo para el patrón y otro más para cada muestra.
 - Pipetear en cada tubo de ensayo:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón (µL)	—	10	—
Muestra (µL)	—	—	10

- Mezclar e incubar 10 minutos a 37 °C o 30 min a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia (A) del patrón y las muestras a una longitud de onda de 505 nm (490-550), frente al blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

Intolerancia a la fructosa/sorbitol

- El estudio de intolerancia a fructosa/sorbitol en los pacientes se realiza mediante un test de hidrógeno en el que se determinan las ppm de hidrógeno en el aire espirado antes y después de la ingesta conjunta de ambos azúcares. Las condiciones de preparación del paciente previas a la prueba son las mismas que en el test de intolerancia a la lactosa.

- La prueba se inicia con la toma de una muestra de aliento. A continuación el paciente ingiere 25 g de fructosa y 5 g de sorbitol disueltos en 250 mL de agua. Para pacientes pediátricos se emplean las mismas cantidades. Tras la ingesta, se miden las ppm de hidrógeno en el aire espirado cada 30 minutos durante 3 horas.
- Anotar los síntomas gastrointestinales que pueda sufrir el paciente durante y en las horas posteriores a la prueba.

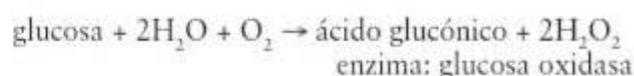
Intolerancia a la galactosa

Ante la sospecha de una intolerancia se administran al paciente 50 g de galactosa por vía oral y se recoge la orina que emite durante las dos horas posteriores a la ingesta. En la muestra de orina primero se descarta la presencia de glucosa y posteriormente se determina la presencia o no de azúcares reductores.

A) Análisis de glucosa en orina:

- Introducir una tira reactiva en la muestra de orina y eliminar el exceso de la misma contra el borde del recipiente.
- Comparar el área reactiva con la escala de colores exactamente 10 s después de haberla mojado. No hay que tener en cuenta las variaciones posteriores del color.

Principio químico: es una reacción enzimática doble:



Este ensayo es específico para la glucosa. No se produce reacción cruzada con lactosa, galactosa ni fructosa.

Para realizar la determinación de azúcares reductores, se prepara un tubo para la muestra y otro para el control positivo. Se procede de la siguiente forma:

	Muestra	Control (+)
Reactivo de Benedict (mL)	5	5
Orina problema (mL)	0,4	—
D(+) glucosa anhidra (mL)	—	0,4

Mezclar y llevar a baño maría con agua hirviendo, durante 3 minutos

Retirar y examinar inmediatamente.

Cálculos

Intolerancia a la lactosa

(A) Muestra \times Concentración patrón / (A) Patrón = mmol/L de glucosa en la muestra

Factor de conversión: mmol/L / 0,055 = mg/dL de glucosa

Intolerancia a la galactosa

Valorar de 0 a 4 cruces (+) según el siguiente criterio:

Apariencia	Valoración cualitativa	Concentración aproximada de galactosa mmol/L
azul - verde sin precipitar	0	0-5,5
verde con precipitado amarillo	+	16,5
verde oliva	++	55
marrón - naranja	+++	82,5
rojo ladrillo	++++	110 o más

BIBLIOGRAFÍA

- Oistein Hovde and Per G Farup (2009). A comparison of diagnostic test for lactose malabsorption-which one is the best? *BMC Gastroenterology* 9:82.
- Usai Satta P, Anania C, Astegiano M, Miceli E, Montalto M, Tursi A (2009). H2-breath testing for carbohydrate malabsorption. *Aliment Pharmacol Ther* 29(Suppl. 1)15-18.
- Rumessen JJ (1988). Functional bowel disease: malabsorption and abdominal distress after ingestion of fructose, sorbitol, and fructose-sorbitol mixtures *Gastroenterology*, Sep; 95(3):694-700.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (2006). Chapter 25 Carbohydrates, pp. 837-901. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and molecular diagnostics*. Fourth edition. Elsevier Saunders. United States of America

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Intolerancia a la lactosa

Los resultados de glucosa en sangre e hidrógeno en aliento se presentarían de la siguiente forma:

B	30	60	90	120	150	180	minutos
					-	-	mmol glucosa/L
							ppm H ₂

En presencia de niveles normales de lactasa intestinal, la lactosa será hidrolizada en galactosa y glucosa, y el nivel de glucosa sanguínea se elevará más de 1,1 mmol/L (20 mg/dL) por encima del valor basal, mientras que el hidrógeno en el aire espirado no superará las 20 ppm en ninguno de los puntos puesto que la lactosa no llegará al intestino grueso.

Hay que tener en cuenta que no existe una correlación entre el aumento de hidrógeno en el aire espirado y el grado de intolerancia a la lactosa porque se trata de una prueba cualitativa. Como ayuda a la interpretación de los resultados se puede incluir un comentario. Si el resultado es positivo añadir: "los resultados son compatibles con intolerancia a la lactosa" o "se observa una intolerancia a la lactosa". Si el resultado es negativo, el comentario puede ser de este tipo: "los resultados son compatibles con la normalidad" o "no se observa intolerancia a la lactosa".

Intolerancia a fructosa/sorbitol

Los resultados de hidrógeno en el aire espirado se presentarían de la siguiente forma:

B	30	60	90	120	150	180	minutos
							ppm H ₂

Se confirma la malabsorción cuando en algún punto de la prueba el nivel de hidrógeno en el aliento es superior en 10 ppm al valor basal.

Como en el caso anterior, se puede añadir un comentario como ayuda a la interpretación de los resultados, en este caso "el resultado es compatible con una intolerancia a la fructosa/sorbitol" o "no se observa intolerancia a la fructosa/sorbitol".

Intolerancia a la galactosa

glucosuria: resultado (+) o (-)

color final de reacción: azul-verde sin precipitar / verde con precipitado amarillo (ver pág. 254, Intolerancia a la galactosa, apariencia:) / verde oliva / marrón-naranja / rojo ladrillo

valoración cualitativa: resultado negativo (-) o resultado positivo (+)/(+)/(+)/(+)

concentración de galactosa aproximada en mmol/L:

Hay que tener en cuenta que un resultado en orina negativo para glucosa y positivo para azúcares reductores, requiere la identificación de la galactosa mediante técnicas cromatográficas.

COMENTARIOS

Evaluación de las alteraciones del metabolismo lipídico

A. González Hernández y E. Alegre Martínez

INTRODUCCIÓN

Los lípidos mayoritarios del organismo son los triglicéridos y el colesterol, que provienen tanto de la síntesis endógena como de la ingesta de alimentos. Los triglicéridos constituyen más del 90% de las grasas que se ingieren normalmente y el resto están formadas por colesterol y otros esteroides, fosfolípidos, vitaminas liposolubles, etc. Solamente una cuarta parte del colesterol proviene de la dieta, mientras que el resto proviene de la síntesis endógena por diversos tejidos, sobre todo el hígado.

Los triglicéridos son ésteres de ácidos grasos y glicerol, y el colesterol es un esteroide. Tanto los triglicéridos como el colesterol son insolubles en agua y para su transporte plasmático precisan estar incluidos en unas estructuras llamadas lipoproteínas. Éstas son unos complejos esféricos con una parte interna hidrofóbica donde se encuentran el colesterol esterificado y los triglicéridos, y una parte externa hidrofílica donde se encuentran los fosfolípidos, el colesterol no esterificado y las proteínas (apolipoproteínas). Las principales lipoproteínas circulantes son:

- Quilomicrones. Son las lipoproteínas más grandes y contienen sobre todo triglicéridos. Se sintetizan en el intestino tras las comidas, y transportan los lípidos procedentes de la dieta. No están presentes en circulación en ayunas.
- Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Se sintetizan en el hígado y su principal función es el transporte de triglicéridos endógenos.
- Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Se forman por el metabolismo de las VLDL en circulación. Una parte se capta en el hígado y otra se sigue metabolizando a LDL.
- Lipoproteínas de baja densidad (LDL). Son las lipoproteínas más ricas en colesterol.
- Lipoproteínas de alta densidad (HDL). Se sintetizan en el hígado e intestino. Son las de menor tamaño y las más ricas en proteínas y fosfolípidos.

Las hiperlipidemias (elevación de la concentración de lípidos en sangre) son una de las anomalías bioquímicas más frecuentes en la sociedad occidental. Su frecuencia y severidad aumenta con la edad y sus causas pueden ser tanto genéticas como dietéticas o asociadas a otros procesos patológicos. Las malas costumbres alimentarias, el consumo excesivo de alcohol, el tabaquismo y algunos fármacos pueden provocar una elevación de los lípidos.

Fredrickson clasificó las hiperlipidemias fenotípicamente en seis tipos, según la lipoproteína que esté aumentada en la sangre, pero sin tener en cuenta la causa. Esta clasificación fue aceptada por la OMS y ha sido ampliamente utilizada (Tabla P25-1).

Es importante la evaluación y seguimiento de las hiperlipidemias debido al riesgo de arterioesclerosis y enfermedad cardíaca que conllevan. Por ello, diversas guías clínicas, como el *National Cholesterol Education Program Panel III*, han recomendado realizar estudios del perfil lipídico para estimar el riesgo cardiovascular global. Estas guías han establecido unos rangos de referencia de colesterol y triglicéridos plasmáticos que se correlacionan con unos estados de riesgo cardiovascular (Tabla P25-2).

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es valorar el perfil lipídico de un individuo y asociarlo con su riesgo cardiovascular.

Tabla P25-1. CLASIFICACIÓN MODIFICADA POR FREDRICKSON DE LAS DISLIPEMIAS

Tipo	Frecuencia	Lipoproteína aumentada	Lípido elevado	Aspecto suero
I	Baja	Quilomicrones	Triglicéridos (+++)	Capa cremosa
IIa	Elevada	LDL	Colesterol (+++)	Claro
IIb	Elevada	LDL VLDL	Triglicéridos (+) Colesterol (++)	Claro/Turbio
III	Baja	IDL	Triglicéridos (++) Colesterol (++)	Turbio
IV	Elevada	VLDL	Triglicéridos (++) Colesterol (+)	Turbio
V	Baja	Quilomicrones VLDL	Triglicéridos (+++) Colesterol (++)	Capa cremosa e inferior turbio

Tabla P25-2. CONCENTRACIONES RECOMENDADAS DE COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS (mg/dL) (MODIFICADO DEL NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM, ADULT TREATMENT PANEL III)

Estado	Colesterol total	Colesterol-LDL	Colesterol-HDL	Triglicéridos
Óptimo	< 200	< 100	> 60	< 150
Cerca de lo óptimo		< 100-129		
Nivel límite	200-239	130-159		150-199
Alto	> 240	> 160		> 200

PROCEDIMIENTO

Fundamento

El aspecto macroscópico de la muestra puede dar una idea del perfil lipídico del individuo. Así, una muestra transparente indica que la lipemia es normal o bien una hiperlipemia tipo IIa, un incremento de LDL puede ocasionar un color anaranjado debido a los carotenos, cuando los triglicéridos tienen una concentración superior a 300 mg/dL el plasma adquiere un aspecto turbio y, si la muestra se almacena refrigerada, los quilomicrones aparecen como una capa cremosa en la parte superior de la muestra.

Los métodos de determinación de triglicéridos generalmente se basan en la liberación del glicerol

de los triglicéridos mediante una hidrólisis enzimática o alcalina para su posterior cuantificación. En este caso, emplearemos un kit basado en la liberación del glicerol por la proteína lipasa y su cuantificación a través de una serie de reacciones enzimáticas acopladas. La secuencia de reacciones es la siguiente:

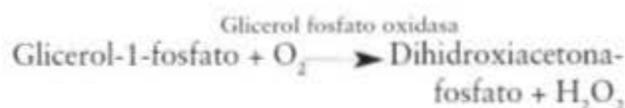
- Hidrólisis de los triglicéridos por la enzima lipoproteína lipasa liberando glicerol:



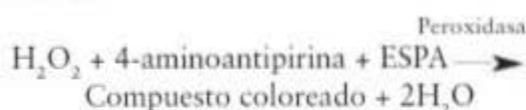
- b) Fosforilación del glicerol a glicerol-1-fosfato por la gliceroquinasa usando adenosina-5'-trifosfato (ATP) que se transforma en ADP:



- Oxidación del glicerol-1-fosfato por la glicerol fosfato oxidasa a dihidroxiacetona-fosfato y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

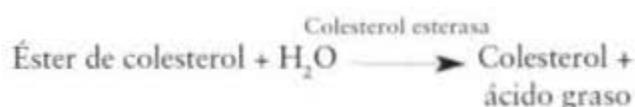


- Finalmente, la peroxidasa cataliza la reacción del H_2O_2 con la 4-aminoantipirina y la N-etil-N-(3-sulfopropil)-m-anisidina (ESPA) para producir un compuesto coloreado que absorbe a 540 nm:

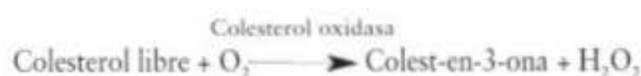


El incremento de absorbancia a 540 nm es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra.

La cuantificación de colesterol se realiza habitualmente mediante métodos enzimáticos acoplados, fácilmente adaptables a autoanalizadores. Como aproximadamente 2/3 del colesterol circulante se encuentra esterificado, la primera reacción consiste en la hidrólisis de los ésteres de colesterol a colesterol libre por la enzima colesterol esterasa:



Posteriormente, la colesterol oxidasa oxida el colesterol a colest-en-3-ona liberando H_2O_2 .



Finalmente, la peroxidasa cataliza la reacción del H_2O_2 con 4-aminofenazona y fenol para formar un compuesto coloreado rojo que absorbe a 505 nm. El incremento de absorbancia a 505 nm es directamente proporcional a la concentración de colesterol en la muestra.



La lipoproteína HDL, a diferencia del resto de lipoproteínas, carece de la apoproteína apo B. La separación de las lipoproteínas, menos densas y que contienen apo B, se puede realizar mediante precipitación con fosfotungstato y magnesio. De esta forma, tras la centrifugación para separar las lipoproteínas precipitadas, las lipoproteínas HDL son las únicas que permanecen en el sobrenadante, donde se puede cuantificar el colesterol-HDL mediante la técnica descrita anteriormente.

El contenido de colesterol-LDL se puede determinar empleando la fórmula de Friedewald una vez cuantificadas las concentraciones de triglicéridos, colesterol total y colesterol-HDL:

$$\text{colesterol-LDL} = \text{colesterol total} - (\text{colesterol-HDL} + \text{Triglicéridos}/5)$$

Hay que considerar que a medida que la concentración de triglicéridos incrementa, también lo hace la inexactitud de la fórmula, por lo que no se puede aplicar la fórmula de Friedewald para el cálculo del colesterol-LDL si la concentración de triglicéridos es mayor de 400 mg/dL (4,6 mmol/L).

Material y equipos

Muestras

- 5 mL de sangre de un voluntario extraída en un tubo sin anticoagulante.

Equipos

- Centrífuga.
- Espectrofotómetro que pueda leer a 540 y 505 nm.
- Baño termostático a 37 °C.

Material

- Micropipetas de 10-100 μL y de 100-1.000 μL .
- Tubos de ensayo.
- Cubetas de muestra para el espectrofotómetro.
- Guantes de laboratorio.

Reactivos

Determinación de triglicéridos

- Kit de determinación de triglicéridos que contenga: lipasa, ATP, Mg^{2+} , 4-aminoantipirina, sal sódica de la N-etil-N-(3-sulfopropil)-m-

anisidina, gliceroquinasa, glicerol fosfato oxidasa y peroxidasa.

- Estándar de glicerol equivalente a 250 mg/dL de trioleína.

Determinación del colesterol total

- Kit de determinación de colesterol que contiene: Mg²⁺, 4-aminofenazona, fenol, colesterolesterasa, colesteroloxidasa y peroxidasa.
- Estándar de colesterol.

Determinación de colesterol en HDL

- Reactivos de precipitación:
 - Ácido fosfotúngstico 4,8 g/dL.
 - Cloruro de magnesio 3 M: disolver 60,9 g de MgCl₂ × 6H₂O en 100 mL de agua destilada.
 - La solución precipitante se prepara mezclando 5 partes de ácido fosfotúngstico con 1 parte de cloruro de magnesio. Este reactivo es estable 3 semanas a 4 °C.
- Reactivo de determinación de colesterol.
- Estándar de colesterol.

Protocolo

Evaluación del aspecto de la muestra

Extraer a un voluntario 5 mL de sangre en un tubo sin anticoagulante. Esperar 15- 20 minutos para que se produzca la coagulación y centrifugar 10 minutos a 1.000-1.200 g. Transferir la parte superior que corresponde al suero a un nuevo tubo y dejarla reposar toda la noche (16-18 h) en la nevera a 4 °C. Examinar el tubo cuidadosamente bajo una luz intensa con un fondo oscuro.

Determinación de triglicéridos

1. Marcar 3 tubos como blanco, estándar y muestra.
2. Añadir el reactivo a los tubos según las especificaciones del kit elegido.
3. Añadir H₂O, estándar y muestra a los respectivos tubos según las especificaciones del kit elegido.

4. Incubar los tubos durante el tiempo y a la temperatura indicados por las especificaciones del kit.
5. Leer en el espectrofotómetro y anotar las absorbancias del blanco (A_{BT}), estándar (A_{ET}) y muestra (A_{MT}).

Determinación del colesterol total

1. Marcar 3 tubos como blanco, estándar y muestra.
2. Añadir el reactivo a los tubos según las especificaciones del kit elegido.
3. Añadir H₂O, estándar y muestra a los respectivos tubos según las especificaciones del kit elegido.
4. Incubar los tubos durante el tiempo y a la temperatura según las especificaciones del kit.
5. Leer en el espectrofotómetro y anotar las absorbancias del blanco (A_{BC}), estándar (A_{EC}) y muestra (A_{MC}).

Determinación de colesterol en HDL

1. Añadir 0,1 mL de reactivo precipitante a 1 mL de suero. Mezclar y dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Centrifugar durante 10 minutos a 1.000-1.200 g.
3. Determinar el colesterol en el sobrenadante mediante el procedimiento que se indica en la sección anterior.

Cálculos

Determinación de triglicéridos

$$\text{Triglicéridos (mg/dL)} = \frac{(A_{MT} - A_{BT})}{(A_{ET} - A_{BT})} \times \text{Concentración de Estándar (mg/dL)}$$

Conversión: para convertir la concentración en mg/dL a mmol/L se multiplica el resultado por 0,0113.

Determinación del colesterol total y del colesterol-HDL

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{(A_{MC} - A_{BC})}{(A_{EC} - A_{BC})} \times \text{Concentración de Estándar (mg/dL)}$$

Conversión: para convertir la concentración de mg/dL a mmol/L se multiplica el resultado por 0,026.

Determinación de colesterol en LDL

$$\text{Colesterol-LDL (mg/dL)} = \text{colesterol total (mg/dL)} - (\text{colesterol-HDL (mg/dL)} + \text{triglicéridos (mg/dL)/5})$$
$$\text{Colesterol-LDL (mmol/L)} = \text{colesterol total (mmol/L)} - (\text{colesterol-HDL (mmol/L)} + \text{triglicéridos (mmol/L)/2,2})$$

BIBLIOGRAFÍA

- Burtis CA, Ashwood ER, Burns DE (eds.) (2005). *Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Other Cardiovascular Risk Factors*. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier Saunders. 4.ª ed. St Luis.
- Kaplan LA, Pesce AJ (2010). *Coronary Artery Disease: Lipid Metabolism*. Clinical Chemistry: Theory, Analysis Correlation. Mosby Elsevier. 5.ª ed. St. Luis.
- NACB LMPG Committee Members (2009). *National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice guidelines: emerging biomarkers for primary prevention of cardiovascular disease*. Clin Chem 55:378-84.
- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report (2002). Circulation 106:3143-421.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Aspecto de la muestra:

Concentración de colesterol total:

Concentración de colesterol-HDL:

Concentración de colesterol-LDL:

Fenotipo lipídico del individuo según la tabla P25-1:

Valoración del riesgo cardiovascular según el perfil lipídico según la tabla P25-2:

COMENTARIOS



Determinación de la albúmina, transtiretina, transferrina y proteína transportadora del retinol (RBP) como índices del metabolismo proteico

N. Varo Cenarruzabeitia y M. C. Mugueta Uriaque

INTRODUCCIÓN

Algunas proteínas de origen hepático reducen sus niveles plasmáticos cuando la ingesta proteica es insuficiente y vuelven a su nivel normal una vez restaurado el aporte. La respuesta de las proteínas a los cambios dietéticos depende de su vida media. La albúmina, prealbúmina, transferrina y proteína transportadora del retinol se utilizan como marcadores de la depleción proteica nutricional:

1. La albúmina (68,5 kDa) es la proteína más abundante del plasma (40-60% del total). Se sintetiza en el hígado en función de la ingesta proteica y de su concentración en sangre. Constituye un reservorio de aminoácidos fácilmente disponibles para las células. Su vida media es de unos 21 días por lo que su concentración no desciende hasta que ocurre una malnutrición prolongada. La determinación de albúmina en sangre se utiliza con frecuencia en el seguimiento del estado nutricional. Una concentración inferior a 30 g/L indica pérdida de proteína.
2. La transferrina es una glicoproteína de 77 kDa de síntesis hepática cuya función principal es el transporte de hierro. Debido a que su vida media es de 8-10 días, refleja de forma más temprana que la albúmina el deterioro nutricional y su concentración plasmática correlaciona bien con cambios rápidos en la deficiencia proteica. Su síntesis hepática se ve muy afectada por el suministro de aminoácidos por lo que puede utilizarse para valorar la respuesta al aporte nutricional. Sin embargo, otros factores pueden afectar a su síntesis, entre los que se encuentran el déficit de hierro, en el cual existe

una inducción positiva, al igual que en la reacción de fase aguda.

3. De las proteínas con rápido aclaramiento, se consideran la transtiretina (prealbúmina) y la proteína transportadora del retinol, como las más indicativas del estado nutricional. La vida media de la prealbúmina es de 2,5 días. Su concentración desciende rápidamente cuando hay baja ingesta energética, incluso aunque haya adecuada ingesta proteica. Es un indicador más sensible que la albúmina de la deficiencia proteica y de la recuperación con el tratamiento.

La proteína transportadora de retinol (21 kDa) tiene una vida media muy corta, de unas 12 horas. Circula unida de forma equimolecular con la prealbúmina, formando un complejo que es el único transportador específico de la vitamina A (retinol). Disminuye de forma temprana y rápida en casos de malnutrición, ya que su síntesis es muy sensible al aporte de aminoácidos y, sobre todo, cuando hay una restricción energética. Debido a su bajo peso molecular se filtra en el glomérulo y prácticamente toda se reabsorbe en los túbulos. Las enfermedades renales, especialmente tubulares, y los tratamientos con fármacos nefrotóxicos incrementan su excreción urinaria.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica consiste en determinar los valores plasmáticos de albúmina, prealbúmina, transferrina y proteína fijadora del retinol como marcadores del estado nutricional.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Existen diferentes métodos de laboratorio para cuantificar estas proteínas. Es muy frecuente la cuantificación por métodos inmunoquímicos utilizando antisueros específicos y midiendo los complejos antígeno-anticuerpo mediante nefelometría, turbidimetría, inmunodifusión radial o electroinmunodifusión. Por su rapidez y facilidad, la nefelometría y turbidimetría son los métodos más utilizados para la mayoría de proteínas sanguíneas. Ambos métodos miden la luz dispersada. La nefelometría (*nefelo*: nube; *metría*: medida) permite determinar el número y tamaño de las partículas de una suspensión midiendo la intensidad de la luz dispersada por las partículas con un detector en un ángulo de 90° con respecto a la luz incidente. La turbidimetría mide la luz dispersada a 180° con respecto a la luz incidente (Fig. P26-1). Se añaden cantidades variables de antígeno a cantidades constantes de antisuero específico, por lo que se forman complejos inmunes en suspensión, los cuales consiguen dispersar un haz de luz incidente. El instrumento mide la relación de intensidad de luz dispersa en relación con la intensidad de luz incidente. Las intensidades se comparan con un estándar de concentración conocida. La elección entre la turbidimetría o nefelometría depende de la aplicación y de la instrumentación disponible. Se pueden hacer técnicas turbidimétricas con la mayoría de los espectrofo-

tómetros, sin embargo, la principal desventaja es el alto ratio señal-ruido. La nefelometría generalmente es más sensible.

Material y equipos

Muestras y/o material biológico

- Suero o plasma humano.

Equipos

- Equipo de nefelometría.
- Espectrofotómetro.

Material

- Colorimetría para determinar albúmina (kit comercial de Spinreact).
- Turbidimetría para cuantificación de prealbúmina (kit comercial de Spinreact).

Reactivos

- Antisueros específicos producidos en conejo frente a:
 - Albúmina humana.
 - Prealbúmina.
 - Transferrina.
 - Proteína transportadora de retinol.

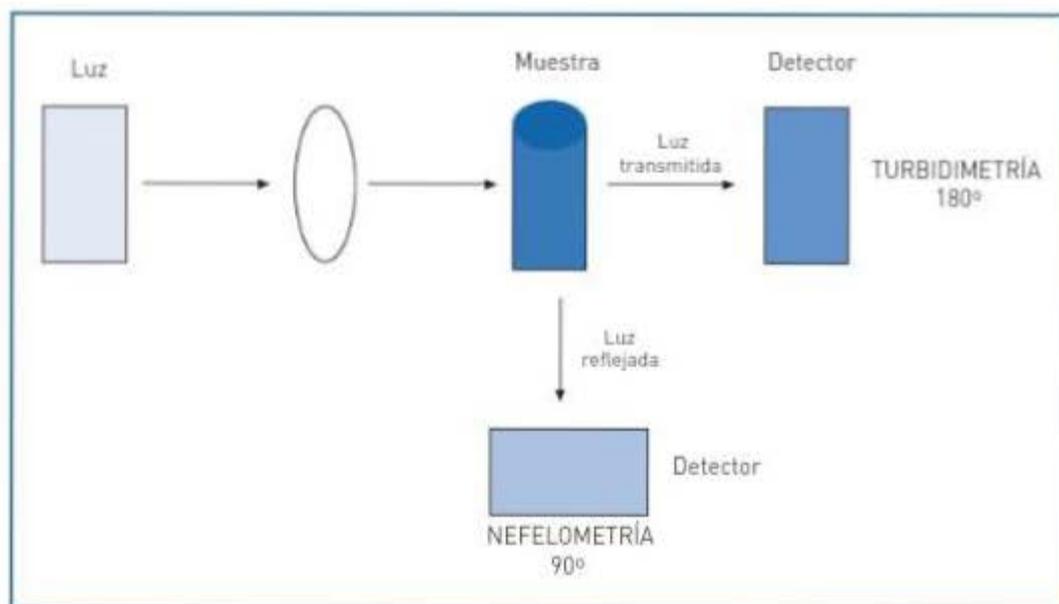


Figura P26-1. Esquema de la nefelometría y turbidimetría.

Protocolo

Nefelometría

Aunque se suele considerar el método de referencia para la cuantificación de la mayoría de las proteínas séricas requiere equipos específicos.

Colorimetría para determinar albúmina

1. Pipetear en tres tubos las cantidades que se indican en la Tabla P26-1.
2. Mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Leer las absorbancias del patrón y de las muestras a 630 nm frente al blanco.

Turbidimetría para cuantificación de prealbúmina

1. Hacer diluciones seriadas a 1/2 para preparar una curva de calibración de 6 puntos disolviendo el calibrador de proteínas en suero fisiológico. La concentración más alta de la curva se-

Tabla P26-1. PROCEDIMIENTO

	Blanco	Patrón	Muestra
Verde de bromocresol	1 mL	1 mL	1 mL
Suero o plasma	-	-	5 µL
Patrón	-	5 µL	-

rá de 67 mg/dL. La Tabla P26-2 resume los volúmenes a emplear.

2. Mezclar y leer la absorbancia (A1) a 340 nm.
3. Añadir 50 µL de anticuerpo a todos los tubos.
4. Mezclar y leer la absorbancia (A2) a 340 nm, exactamente dos minutos después de haber añadido el anticuerpo.

Cálculos

Colorimetría para determinar albúmina

$$\text{Concentración albúmina (g/dL)} = A(\text{muestra}) \times 5/A(\text{patrón})$$

Tabla P26-2. PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN Y MEDIDA

	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6	Muestra
Diluyente	950 µL						
Calibrador	10 µL	-					
Muestra	-	-	-	-	-	-	10 µL

Tabla P26-3. VALORES DE REFERENCIA

	Valores de referencia (SI, µmol/L)	Valores de referencia [unidades convencionales]	Factor de conversión	Estado nutricional deficitario
Albúmina	478-724	3.300-5.000 mg/dL	g/L × 0,1449 = µmol/L	3.000 mg/dL
Transferrina	22-44	200-400 mg/dL	mg/dL × 0,11 = µmol/L	150 mg/dL
Transtiretina	1,7-6,7	10-40 mg/dL	mg/dL × 0,167 = µmol/L	10 mg/dL
Proteína transportadora del retinol	2,8-5,7	3-6 mg/dL	mg/dL × 0,95 = µmol/L	2 mg/dL

Turbidimetría para cuantificación de prealbúmina

Calcular la diferencia de absorbancias (A2-A1) para cada punto de la curva de calibración. Dibujarlo sobre papel milimetrado e interpolar la (A2-A1) de las muestras en la curva de calibración.

La Tabla P26-3 resume algunos parámetros de estas proteínas.

BIBLIOGRAFÍA

Clinical nutrition (The Nutrition Society Textbook). Edited by Michael J. Gibney, Marinos Elia, Olle Ljungqvist, Julie Dowsett.

Fuhrman MP, Charney P, Mueller CM (2004). Hepatic proteins and nutrition assessment. *J Am Diet Assoc* 104(8):1258-64.

Johnson AM (2006). Amino acids, peptides, and proteins. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, Norbert W. Tietz (eds.).



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Un varón de 69 años ingresa para cirugía por obstrucción intestinal por neoplasia de recto. Se cuantifican algunas proteínas para la valoración de su estado nutricional proteico. Tras la intervención comienza a administrarse nutrición parenteral (NP) y se valora su estado semanalmente. Habitualmente pesaba 70 kilos y en el momento del ingreso pesa 59. La Tabla P26-4 recoge los resultados de los análisis realizados.

Tabla P26-4. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DEL PACIENTE

	Un mes antes	Ingreso	Tras NP	Un mes después
Albúmina (mg/dL)	2.380	2.150	2.400	2.670
Transferrina (mg/dL)	140	120	160	240
Transtiretina (mg/dL)	8,2	5,7	16,2	20,4
Prot trans de retinol (mg/dL)	1,7	1,2	2,7	4,0
Peso (kg)	63	59	62	64
IRN	71,6	67,7	73,3	78,6

La malnutrición puede encontrarse en pacientes con cáncer, como en este caso. Asimismo, la malnutrición en pacientes hospitalizados es un problema frecuente que muchas veces pasa inadvertido y constituye un factor de mal pronóstico. Un parámetro de utilidad calculado es el Índice de riesgo nutricional (IRN), que evalúa la desnutrición en los enfermos y la indicación de nutrición perioperatoria: $IRN = 15,19 \times \text{albúmina (g/dL)} + 41,7 \times (\text{peso actual/habitual})$. Un IRN superior a 100 indica un buen estado nutricional, mientras que si es inferior a 83,5 indica una desnutrición grave.

El paciente, ya en el momento del ingreso presenta un estado de malnutrición proteico-calórica reflejado en el cambio en el peso, bajo IRN y niveles bajos de todas las proteínas analizadas. Tras la nutrición parenteral hay una buena respuesta que se objetiva por la elevación rápida y relativamente marcada de transtiretina y proteína transportadora de retinol. Finalmente, un mes después la elevación de la albúmina indica una consolidación del estado nutricional.



COMENTARIOS

A large, empty light blue rectangular area intended for writing comments or notes.

Biodisponibilidad de minerales

S. Navas-Carretero y M. T. Macarulla Arenaza

INTRODUCCIÓN

Los minerales constituyen un grupo de nutrientes esencial para el correcto funcionamiento del organismo, ya que realizan importantes labores estructurales y/o moduladoras del metabolismo. La esencialidad de estos micronutrientes obliga a incluirlos en la dieta en cantidades adecuadas, debido a su carácter inorgánico (no son sintetizados) y a las pérdidas fisiológicas que se producen de los mismos. Los requerimientos diarios de dichos minerales varían en función de las características antropométricas y fisiológicas de cada individuo, siendo las que más se tienen en cuenta la edad, sexo, situaciones fisiológicas específicas o la presencia de patologías.

Para comprobar si la cantidad de un determinado mineral aportada por la dieta es suficiente para cubrir las necesidades de un organismo, es conveniente determinar su balance, es decir, su retención, que debe ser mayor de 0 para individuos en crecimiento e igual a 0 para individuos sanos que ya han alcanzado su máximo desarrollo. Esto se lleva a cabo a través de la medida de la ingesta y de las pérdidas del mineral concreto, que en su mayor parte tienen lugar por vía fecal y urinaria.

Por otro lado, no todo el mineral de una dieta está disponible, puesto que en ocasiones está formando parte de moléculas o complejos que no permiten su liberación durante la digestión, limitando por tanto su absorción. Tal es el caso de los fitatos, taninos, oxalatos, algunas fibras dietéticas, y otros, que suelen disminuir, en algunos casos notablemente, la biodisponibilidad de minerales, sobre todo de cationes divalentes y trivalentes.

En relación al hierro, este mineral es un nutriente esencial que participa en procesos vitales claves

como son el transporte de oxígeno por la sangre, la cadena respiratoria mitocondrial, múltiples reacciones de óxido-reducción celulares, etc. No todo el hierro que se ingiere puede ser aprovechado ya que su grado de absorción depende de varios factores, como son las necesidades del organismo, su forma química y otros componentes de la dieta. A este respecto, el hierro de los alimentos se puede encontrar como hierro *hemo* o como hierro *no hemo*. El primero posee un grado de absorción elevado e independiente de otros factores dietéticos, mientras que el segundo debe estar en su forma reducida (Fe^{2+}) para poder ser absorbido, por lo que todos aquellos factores que provoquen su reducción mejoran su grado de absorción. Tal es el caso de la vitamina C que, además de formar con él complejos disociables de fácil absorción, mantiene al hierro de los alimentos en su forma ferrosa y provoca en gran medida la reducción del hierro férrico presente en los mismos.

Por otra parte, las proteínas de las carnes y pescados también facilitan la absorción del hierro no hemo porque contienen cantidades importantes de ciertos aminoácidos que forman con él complejos disociables y algunos de ellos poseen además propiedades reductoras.

Por todo ello, para calcular cuánto hierro se absorbe de una comida concreta no basta con saber cuánto contiene, sino también qué tipo de hierro es, la cantidad de carne y/o pescado que posee y la cantidad de vitamina C que se ingiere con ella ([Tabla P27-1](#)).

OBJETIVO

En esta práctica se plantean dos objetivos, siendo el primero estudiar el grado de absorción,

Tabla P27-1. BIODISPONIBILIDAD DEL HIERRO DE LAS COMIDAS EN FUNCIÓN DE SU CONTENIDO EN CARNE Y/O PESCADO Y VITAMINA C

Tipo de comida		Absorción de hierro [%]			
Contenido en		Fe no hemo		Fe hemo	
Carne y/o pescado (g)	Vitamina C (mg)	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
Disponibilidad baja < 30 < 25		2	3	15	23
Disponibilidad media < 30 25-75 30-90 < 25		3	5		
Disponibilidad alta > 90 Indistinto Indistinto > 75 30-90 25-75		4	8		

la eliminación renal y el balance nutritivo o retención de hierro, cobre y zinc en función de la edad y de la presencia en la dieta de un agente complejante de iones divalentes. En segundo lugar se determinará el aporte de hierro de una comida y predecirá su grado de absorción.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

La concentración de hierro, cobre y zinc se analiza mediante la técnica de espectrometría de absorción atómica. Una vez obtenida una disolución de los minerales tras incinerar o diluir la muestra, se realiza una lectura de la muestra con lámparas de cátodo hueco específicas para cada mineral y se contrasta la absorción de la luz producida por la muestra con respecto a la recta de patrones introducida previamente.

Para estimar el aporte dietético de hierro y el grado de absorción, se necesitan tablas de composición de alimentos, las cuales tras una entrevista con el paciente nos ayudarán a evaluar tanto la cantidad como la calidad del hierro ingerido, y valorar así el posible riesgo de una ingesta deficitaria de hierro.

Material y equipos

Absorción, excreción y balance nutritivo de minerales

Muestras biológicas

- Ratas jóvenes y adultas.
- Heces y orina de las ratas.

Equipos

- Balanza.
- Congelador.
- Mufla.
- Placas calefactores.
- Espectrofotómetro de absorción atómica con lámparas de cátodo hueco para hierro, cobre y zinc.

Material

- Jaulas de metabolismo.
- Frascos de recogida de heces y orina.
- Pipetas.
- Embudos.

- Dieta normal.
- Dieta con ácido fítico o hexafosfato de mioinositol (2 g/kg de dieta).
- Crisoles de porcelana.
- Botes de plástico.
- Matraces aforados (de 50 o 100 mL)

Nota: Todos los materiales deben limpiarse con ácido diluido (HNO_3 al 10%) y aclararse con agua MiliQ para evitar la presencia de contaminantes.

Reactivos

- HNO_3 (c).
- H_2SO_4 (c).
- H_2O_2 30 volúmenes.
- Mezcla ácida (HNO_3 : HCl : agua MiliQ; 1:1:2).
- Disolución madre de hierro 20 ppm: 2 mL de patrón de hierro 1.000 ppm enrasados a 100 mL con agua.
- Disolución madre de cobre 10 ppm: 1 mL de patrón de cobre 1.000 ppm enrasado a 100 mL con agua.
- Disolución madre de zinc 10 ppm: 1 mL de patrón de zinc 1.000 ppm enrasado a 100 mL con agua.

Aporte dietético de hierro y grado de absorción

Tablas de composición de alimentos.

Protocolo

Absorción, excreción y balance nutritivo de minerales

Lo primero que se debe realizar es preparar las muestras, es decir, escoger y distribuir los animales en cuatro grupos, que serán de ratas jóvenes de 100 ± 10 g (grupos I y II) y adultas de 250 ± 10 g (grupos III y IV), que se introducen en jaulas de metabolismo. Tras un período de aclimatación de 2-3 días, durante el cual se les proporciona agua y dieta normal *ad libitum*, a las ratas de los grupos II y IV se les cambia la dieta por otra con fitatos, y se comienza el experimento.

Durante 5 días, se controla individualmente la ingesta de dieta y se recogen las heces y orinas,

que se guardan, previamente medidas, en frascos en el congelador. El último día de experimento se vuelven a pesar los animales y se analiza, como se indica a continuación el contenido en hierro, cobre, zinc de las dietas, heces y orinas.

Para la obtención de la muestra procesada que analizaremos en el espectrofotómetro de absorción atómica se deben realizar unos pasos previos. El primer paso a realizar es la carbonización e incineración de las muestras de dietas y heces, y posterior resuspensión de los minerales presentes en las mismas en una disolución ligeramente ácida (en las muestras de orina no es necesario):

• Carbonización:

1. Se pesa una cantidad exacta de la muestra (normalmente 1 g) en un crisol de porcelana resistente a altas temperaturas. El crisol estará previamente desecado, pesado y rotulado en la base con un lápiz de grafito (2B).
2. Se coloca el crisol con la muestra en una placa eléctrica y se añaden unas 5 gotas de H_2O_2 de 30 volúmenes.
3. Se enciende la placa primero a baja temperatura y se va aumentando gradualmente hasta el máximo. Durante todo este proceso hay que estar muy pendiente de que la muestra "no burbujee demasiado y se salga del crisol".
4. Se mantiene a la máxima temperatura hasta que las muestras dejen de humear y estén carbonizadas (negras), lo que puede durar unas horas o dos días.

• Mineralización:

1. Se introducen los crisoles en una mufla, que se enciende a una temperatura de 200°C y se deja un tiempo.
2. Se aumenta gradualmente la temperatura de la mufla hasta llegar a los 500°C vigilando siempre antes de aumentarla que las muestras no humeen.
3. Se mantiene a 500°C durante un mínimo de 4 días (lo recomendable es una semana).
4. Pasado el tiempo necesario, se apaga la mufla y los crisoles se dejan enfriar hasta el día siguiente.

• Evaporación y disolución:

1. En los mismos crisoles, se añaden 1,5 mL de la mezcla ácida a cada muestra, se colocan los crisoles en una placa calefactora, y se enciende la placa a temperatura media para comenzar a evaporar el ácido.

2. La disolución tendrá inicialmente un color amarillo y debe quedar lo más transparente posible. Hay que evitar que la disolución se evapore completamente, por lo que hay que ir añadiendo agua MiliQ conforme vaya quedando muy poca mezcla ácida en el crisol.
3. Una vez que la solución esté casi incolora se evapora el líquido al máximo posible sin llegar a sequedad, y se retira el crisol de la placa.
4. En un matraz aforado de 50 o 100 mL (dependiendo de la concentración habitual de los minerales analizados en la muestra que se ha mineralizado) con un embudo se vierte el contenido del crisol arrastrando todo el contenido con agua MiliQ.
5. Se enrasa el matraz y se transfiriere la muestra a un bote de plástico.

Una vez que tenemos las cenizas diluidas al volumen adecuado, se procederá a la determinación de la concentración de minerales:

1. Una vez que las muestras estén preparadas, se elaboran los patrones para cada mineral tomando los volúmenes de las respectivas disoluciones madre según se indica en la tabla P27-2, y enrasando a 100 mL con agua MiliQ.
2. Se analizan por duplicado, tanto las muestras como los patrones, en un espectrofotómetro de absorción atómica, utilizando lámparas de cátodo hueco específicas para cada elemento (hierro, cobre y zinc).
3. La concentración de cada muestra se calcula interpolando su dato de absorción en su respectiva recta patrón.

Nota: Para evitar la interferencia de errores en la medida se recomienda leer las muestras de forma aleatoria, no con un orden predeterminado.

Aporte dietético de hierro y grado de absorción

Se plantea una comida concreta, por ejemplo, un plato de alubias (100 g) con chorizo (35 g), magro de cerdo (30 g) y tacos de jamón serrano (20 g), acompañado de pan (75 g) y una naranja de postre (200 g). Con los datos de las Tablas de Composición de Alimentos, teniendo en cuenta las porciones comestibles, se calcula la cantidad de vitamina C y de hierro que aporta cada alimento y los totales aportados por la comida completa.

Sabiendo que las recomendaciones de ingesta de hierro son, para adultos jóvenes y sanos, 10 mg/d para el hombre y 18 mg/d para la mujer, se determina si esta comida sería suficiente o no para cubrirlas. Sabiendo que, por término medio, el 40% del hierro de carnes y pescados es hemo, mientras que el resto es no hemo, y que prácticamente el 100% del hierro de los alimentos vegetales es de tipo no hemo, se calcula la cantidad que aporta cada alimento de cada uno de ellos y los totales de cada tipo. Teniendo en cuenta su contenido en carnes y/o pescados y en vitamina C, se clasifica la comida como de “alta”, “media” o “baja” disponibilidad de hierro (ver Tabla P27-1).

Teniendo en cuenta los % de absorción para cada tipo de hierro, se calcula la cantidad total de hierro (hemo + no hemo) que es absorbido, tanto

Tabla P27-2. PREPARACIÓN DE LOS PATRONES DE HIERRO, COBRE Y ZINC

Patrón	Hierro		Cobre		Zinc	
	Disolución madre (mL)	Concentración obtenida (ppm)	Disolución madre (mL)	Concentración obtenida (ppm)	Disolución madre (mL)	Concentración obtenida (ppm)
Blanco	0	0,0	0	0,0	0	0,0
1	2,5	0,5	1	0,1	1	0,1
2	4	0,8	5	0,5	3	0,3
3	5	1,0	10	1,0	5	0,5
4	20	4,0	20	2,0	10	1,0
5	25	5,0	50	5,0		

por el hombre como por la mujer. Sabiendo que el hombre necesita absorber alrededor de 1 mg/d y la mujer unos 2,5 mg/d, se determina si esta comida sería suficiente o no para cubrir estas necesidades.

Nota: Se puede calcular también cómo se modifica la cantidad de hierro que se ingiere y que se absorbe cuando se cambia un alimento por otro similar dentro de la misma comida. Por ejemplo: al cambiar la naranja por un plátano, el chorizo por morcilla (cuyo hierro es aproximadamente un 80% de tipo hemo), etc.

Cálculos

Absorción, excreción y balance nutritivo de minerales

Se calculan las cantidades de minerales ingeridas por cada animal, teniendo en cuenta el total de dieta consumida, y las cantidades eliminadas por cada uno de ellos, teniendo en cuenta los totales de heces y orina excretados.

Se calcula el balance de cada mineral restando al ingerido el total eliminado:

$$BM = M_i - M_e = M_i - (M_h + M_o)$$

Siendo:

BM = balance del mineral

M_i = mineral total ingerido

M_e = mineral total eliminado

M_h = mineral eliminado por heces.

M_o = mineral eliminado por orina

Los resultados se expresan en mg del mineral retenidos/día, y en mg del mineral retenidos/ganancia de peso del animal en g/día.

BIBLIOGRAFÍA

- ASTM D4185. Standard Practice for Measurement of Metals in Workplace Atmospheres by Flame Atomic Absorption Spectrophotometry. <http://www.astm.org/Standards/D7035.htm> (último acceso, abril 2010).
- Gaitán D, Olivares M, Arredondo M, Pizarro F (2006). Biodisponibilidad de hierro en humanos. *Rev Chil Nutr* 33:142-148.
- Hunt JR (2003). Bioavailability of iron, zinc and other trace minerals from vegetarian diets. *Am J Clin Nutr* 78(3 Suppl.):633S-639S.
- Monsen ER, Hallberg L, Layrisse M, Hegsted DM, Cook JD, Mertz W, Finch, CA (1978). Estimation of available dietary iron. *Am J Clin Nutr* 31:134-141.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Absorción, excreción y balance nutritivo de minerales

	Balance de hierro		Balance de cobre		Balance de zinc	
	mg/d	mg/g/d	mg/d	mg/g/d	mg/d	mg/g/d
Grupo I (ratas jóvenes con dieta normal)						
Grupo II (ratas jóvenes con dieta con fitatos)						
Grupo III (ratas adultas con dieta normal)						
Grupo IV (ratas adultas con dieta con fitatos)						

Aporte dietético de hierro y grado de absorción

			Hierro (mg)		
Alimento	Porción comestible (g)	Vitamina C (mg)	Total	Hemo	No hemo
Totales	-				

	Varones	Mujeres
Tipo de comida (disponibilidad)		
Hierro ingerido (mg)		
¿Cubre las recomendaciones diarias de ingesta? (sí o no)		
Hierro absorbido (mg)		
¿Cubre las necesidades diarias de absorción? (sí o no)		

COMENTARIOS



Actividad glutatión reductasa eritrocitaria como indicador en estados de deficiencia de vitamina B₂

S. Lorente-Cebrián, M. Zabala Navó, M. J. Moreno-Aliaga

INTRODUCCIÓN

La glutatión reductasa eritrocitaria (GRE; EC 1.6.4.2) es una enzima dependiente de flavin-adenin dinucleótido fosfato (FAD) que cataliza la reacción de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) y que tiene lugar en los eritrocitos o hematíes. Esta reacción requiere también la presencia de NADPH como agente reductor (donante de electrones) siendo el FAD el factor limitante dicha reacción (P28-1).

El FAD es un cofactor esencial que se une fuertemente a la enzima GRE y cuya presencia es necesaria para la máxima actividad de dicha enzima. El NADPH actúa como agente donante de electrones y el ratio de desaparición de NADPH a lo largo de la reacción es equivalente a la tasa de actividad enzimática. Esta actividad puede ser estimulada *in vitro* mediante la incubación con la cantidad óptima de FAD.

El coeficiente de actividad de la glutatión reductasa eritrocitaria (CA-GRE) representa el ratio entre la actividad enzimática de GRE estimulada con FAD respecto a la actividad no estimulada. Este coeficiente refleja la saturación intracelular de GRE con FAD, cuyos niveles están determinados principalmente por la ingesta de riboflavina o vitamina B₂. Por este motivo, la medición del coeficiente de actividad de la glutatión reductasa eritrocitaria (CA-GRE) es uno de los métodos más utilizados para la valoración del estado nutricional de la vitamina B₂.

Este método resulta especialmente útil en la identificación de estados de alcoholismo crónico asociados a estados carenciales en riboflavina, situaciones de estrés y tratamiento con determinados fármacos (contraceptivos y clorpromacina).

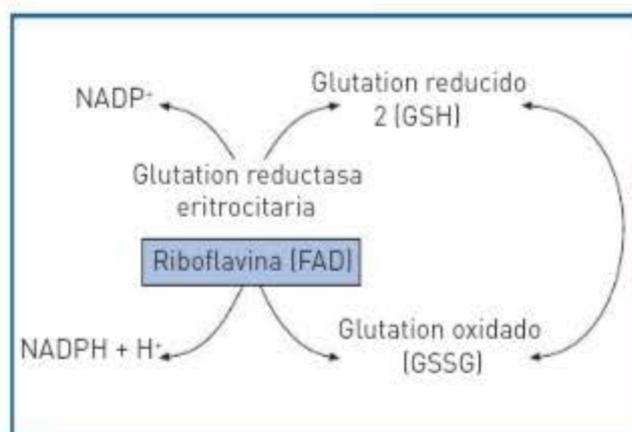


Figura P28-1. Esquema representativo de la reacción de formación de glutatión reducido a partir de glutatión oxidado en presencia de poder reductor (NADPH + H⁺) y catalizada por la enzima glutatión reductasa eritrocitaria en presencia de FAD (indicativo de los niveles de riboflavina o vitamina B₂).

Su principal ventaja, aparte de su simplicidad y rapidez, radica en el hecho de que puede informar sobre posibles estados carenciales en dicha vitamina antes de que aparezcan los síntomas clínicos característicos (dolor de garganta, sequedad de mucosas, dermatitis), constituyendo así un marcador temprano de esta anomalía nutricional.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es evaluar el estado nutricional de la vitamina B₂ de un individuo mediante la determinación del coeficiente de actividad de la glutatión reductasa eritrocitaria (CA-GRE).

PROCEDIMIENTO

Fundamento

La determinación del coeficiente de actividad GRE (CA-GRE) se realiza midiendo la oxidación de NADPH a NADP^+ mediante la cuantificación de la absorbancia a 340 nm con un espectrofotómetro en presencia y ausencia del cofactor FAD.



Matemáticamente, puede expresarse del siguiente modo:

$$\text{CA-GRE} = \frac{\text{Act. enzimática GRE estimulada mediante la adición de FAD}}{\text{Act. enzimática GRE basal (sin adición de FAD)}}$$

La activación de GRE depende de la situación de FAD de la apoenzima y ésta, a su vez, es un indicador de la disponibilidad de riboflavina en el organismo. De esta manera, cuando existe una deficiencia en esta vitamina, la actividad GRE disminuye y la estimulación *in vitro* por FAD aumenta.

En síntesis, se trata de hemolizar los eritrocitos de una muestra con agua destilada, dividir el contenido en dos alícuotas y añadir el sustrato. La disolución de FAD sólo se añade a una de ellas. Después de un breve período de preincubación se analiza la desaparición de NADPH con una prueba cinética.

Material y equipos

Muestras y/o material biológico

- Sangre heparinizada.

Equipos

- Centrífuga.
- Fotómetro con reservorio termostático para cubeta a 35 °C con filtro revestido de Hg a 334 nm.

Material

- Micropipetas.
- Tubos de vidrio de distintos tamaños.

Reactivos

- Ácido cítrico anhidro ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$).
- Citrato sódico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).
- D-glucosa monohidratada ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$).
- Cloruro sódico (NaCl).
- Fosfato dipotásico trihidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4).
- Flavin-adenin dinucleótido, sal disódica (FAD- Na_2).
- Bicarbonato sódico (NaHCO_3).
- Nicotin-amin-adenin-dinucleótido fosfato, reducido (NADPH), sal tetrasódica.
- Etilendiaminotetracético, sal disódica dihidratada ($\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).
- Hidróxido sódico (NaOH).
- Glutatión oxidado (GSSG).
- Agua destilada.

Soluciones

- Estabilizador ACD: ácido cítrico 38 mmol (7,3 g), citrato sódico 74,8 mmol (22,0 g), D-glucosa $\times \text{H}_2\text{O}$ 123,6 mmol (24,5 g) en 1.000 mL de agua.
- Suero salino (NaCl 0,9 %).
- Buffer pH 7,4: solución de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ 67 mmol/L (15,22 g/L) titulada con una solución de KH_2PO_4 67 mmol/L (9,07 g/L) a pH 7,4.
- FAD- Na_2 : 0,29 mmol/L: 1,2 mg disueltos en 5 mL de agua (guardar en oscuridad).
- NADPH: 1,99 mmol/L: 1,66 g de NADPH disueltos en 1.000 mL de agua.
- GSSG: 7,5 mmol/L: 4,6 g de GSSG disueltos en 8 mmol/L (0,32 g/L) de NaOH.

Protocolo

Toma de muestra y procesamiento

1. La sangre heparinizada (3 mL) se recoge sobre 0,75 mL de estabilizador ACD con suave agitación. Puede guardarse en el frigorífico a 4-6 °C

hasta una semana. Debe determinarse el contenido en hemoglobina antes de la adición de ACD.

- Se mezclan suavemente por inmersión los 3 mL de sangre heparinizada con 8 mL de NaCl al 0,9 % en un tubo de centrifuga graduado y se centrifuga a 900 g a 4 °C durante 5 min.
- Tras la centrifugación, se desprecia el sobrenadante aspirándolo con una pipeta Pasteur. El procedimiento de lavado se repite dos veces más, eliminando cada vez el sobrenadante.
- El sedimento obtenido se resuspende en 40 volúmenes de agua fría en un tubo de centrifuga y se mantiene en baño de hielo durante 30 min. Después de quitar los restos de células por centrifugación (900 g a 4 °C durante 15 min), el sobrenadante así obtenido (hemolisado) se guarda en el frigorífico durante 1 hora.

Aplicación de la técnica

- Tras la incubación de la muestra a 4 °C, se pipetea en 4 tubos diferentes y numerados las siguientes cantidades de reactivos (Tabla P21-1).
- Tras la adición de los reactivos necesarios, la reacción se incuba a 37 °C durante 5 minutos. Pasado ese tiempo, se añade a cada uno de los tubos 0,04 mL de GSSG a intervalos de 5 minutos.
- Una vez asegurada la buena mezcla de los reactivos, se mide la absorbancia a 334 nm en un espectrofotómetro. Se utilizará agua destilada como reactivo de referencia (blanco). Una vez medida la absorbancia (E1), se continúa la

Tabla P28-1. ESQUEMA SOBRE LA PREPARACIÓN DE LAS DISTINTAS SOLUCIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATIÓN REDUCTASA ERITROCITARIA

	Tubo 1 (mL)	Tubo 2 (mL)	Tubo 3 (mL)	Tubo 4 (mL)
Buffer pH 7,4	1,12	1,12	1,08	1,08
Hemolisado	0,16	0,16	0,16	0,16
NADPH	0,08	0,08	0,08	0,08
EDTA-Na ₂	0,04	0,04	0,04	0,04
FAD	-	-	0,04	0,04

incubación a 37 °C. Exactamente 10 minutos después de la primera lectura, se vuelve a medir la absorbancia a la misma longitud de onda (E₂).

Cálculos

Coefficiente de la actividad GRE (CA-GRE)

El cálculo se realiza como se indica a continuación:

$$\Delta E = E_1 - E_2$$

El valor promedio de los resultados medidos por duplicado se aplica a la ecuación:

$$\Delta E_{\text{FAD+}} / \Delta E_{\text{FADO}} = \alpha \text{GRE (CA - GRE)}$$

Siendo:

$\Delta E_{\text{FAD+}}$ = Diferencia de absorbancia de las muestras inducidas con FAD

ΔE_{FADO} = Diferencia de absorbancia de las muestras no inducidas con FAD

En ocasiones, pueden obtenerse valores de CA-GRE inferiores a 1,00, lo cual puede ser debido a una inhibición de la glutatión reductasa eritrocitaria (GRE) causada por un exceso de FAD en el medio de la prueba.

Actividad enzimática

La actividad GRE se expresa como mmoles de sustrato convertido por minuto y por litro de suspensión eritrocitaria (compactada) a 37 °C. Dicha actividad la referiremos al contenido en hemoglobina (g/1.000 mL):

$$\frac{\text{Var } E \times 10^6 \times 1.440 \times 150}{10 \times 6,0 \times 10^3 \times 3,9 \text{ Hb (g/L)}} = \text{mmoles sustrato/g Hb} \times \text{seg (U/g Hb)}$$

Donde Var. E/10 es la disminución de absorbancia por min; 1.440 es el volumen total de reacción expresado en μL ; 3,9 los mL de suspensión eritrocitaria en dicho medio de reacción; $6,0 \times 10^3$ representa el coeficiente de absorción molar del NADPH a 334 nm; 150 es la media del contenido en hemoglobina (g/L).

Si la actividad enzimática se expresa en katal, tal y como recomienda el SI, la expresión anterior resultaría:

$$\frac{\text{Var E} \times 24 \times 150}{10 \times 6,0 \times 10^3 \times 3,9 \text{ Hb (g/L)}} = \text{mmoles sustrato/g Hb} \times \text{seg (kat/g Hb)}$$

Valores de referencia

Los valores de referencia de CA-GRE son, por lo general, específicos de cada población. El CA-GRE parece ser independiente del género. En general, se consideran valores aceptables de CA-GRE aquellos inferiores a 1,2 (< 1,2); entre 1,2 y 1,4 son considerados valores bajos y con valores superiores a 1,4 se consideran niveles deficientes. Sin embargo, conviene destacar que el CA-GRE puede verse afectado por otros factores como por ejemplo la concentración de FAD utilizada, la edad de los eritrocitos, edad y situación fisiológica del individuo, etc.

Limitaciones de la técnica

La aplicación del test del CA-GRE es la prueba más utilizada para la determinación del estado nutricional de riboflavina o vitamina B₂ en un individuo, aunque su aplicación es limitada. De hecho, se desaconseja la utilización de esta metodología en diversas situaciones fisiopatológicas, entre las que podemos destacar:

- Situaciones de deficiencia de piridoxina (vitamina B₆). La actividad de la GRE está disminuida sin variar el coeficiente de actividad.
- Anemia ferropénica, uremia severa y cirrosis hepática. Estas situaciones producen una elevación en la actividad de la GRE.
- Deficiencia en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Esta deficiencia ocasiona que los niveles de CA-GRE sean normales pese a la evidencia clínica de carencia de riboflavina.

Sin embargo, a lo largo de los últimos años se han venido desarrollado otros métodos que permiten la determinación de riboflavina en individuos que presentan alguna de las situaciones anteriores. Recientemente, se ha sugerido la determinación de la actividad piridoxamina fosfato oxidasa (PPO) eritrocitaria como método para la determinar los niveles de riboflavina mediante métodos de fluorescencia y radioactividad. Estudios en ratas han demostrado que la actividad de esta enzima (PPO) es sensible a cambios en los niveles de riboflavina y demostró tener una sensibilidad mayor que el ensayo convencional de GRE. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar la idoneidad de la aplicación de esta técnica como método para estudio de los niveles de riboflavina.

BIBLIOGRAFÍA

- Bayoumi RA, Rosalki SB (1976). Evaluation of methods of coenzyme activation of erythrocyte enzymes for detection of deficiency of vitamins B1, B2, and B6. *Clin Chem* 22,327-335.
- Hill MH, Bradley A, Mushtaq S. (2009). Effects of methodological variation on assessment of riboflavin status using the erythrocyte glutathione reductase activation coefficient assay. *Br J Nutr* 102,273-278.
- Mushtaq S, Su H, Hill MH. (2009). Erythrocyte pyridoxamine phosphate oxidase activity: a potential biomarker of riboflavin status? *Am J Clin Nutr* 90,1151-1159.
- Organización Mundial de la Salud / World Health Organization (WHO / OMS). http://libdoc.who.int/publications/2004/9241546123_chap1.pdf (último acceso, abril 2010).
- Organización Mundial de la Salud / World Health Organization (WHO / OMS). <http://www.cmro.who.int/Publications/EMHJ/0506/19.htm> (último acceso, abril 2010)

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



E1 =

E2 =

ΔE =

$$\text{CA-GRE} = \frac{\text{Var E} \times 10^6 \times 1.440 \times 150}{10 \times 6,0 \times 10^3 \times 3,9 \text{ Hb (g/L)}} = \text{mmoles sustrato/g Hb} \times \text{min (U/g Hb)}$$

$$\text{CA-GRE} = \frac{\text{Var E} \times 24 \times 150}{10 \times 6,0 \times 10^3 \times 3,9 \text{ Hb (g/L)}} = \text{mmoles sustrato/g Hb} \times \text{seg (kat/g Hb)}$$

COMENTARIOS



Determinación de la vitamina B₆

A. Moleres Villares, T. Rendo-Urteaga, C. Galbete Ciaurriz y A. Martí del Moral

INTRODUCCIÓN

La vitamina B₆ o piridoxina es una vitamina hidrosoluble que puede presentarse en tres formas diferentes derivadas de la 3-hidroxi-2-metilpirimidina (Fig. P29-1). Entre ellas la coenzima piridoxal 5'-fosfato (PLP) es la más abundante en plasma (60%) y actúa en la mayor parte de las reacciones llevadas a cabo por las enzimas aminotransferasas.

La absorción intestinal de vitamina B₆ tiene lugar sobre todo en el yeyuno y en el íleon y su excreción se produce a través de la orina. Cada día se excretan de esta forma alrededor de 2 mg de esta vitamina.

FUENTES DE PIRIDOXINA Y RECOMENDACIONES

La vitamina B₆ se encuentra en la mayor parte de los alimentos, siendo las mejores fuentes en la dieta el hígado, las nueces, el pollo y los plátanos.

Todos ellos contienen más de 0,5 mg/100 g de alimento crudo. Esta vitamina es estable a la acción de agentes oxidantes, pero muy sensible a la luz. El precocinado y la técnica de conservación de los alimentos producen pérdidas en el contenido de vitamina B₆ de los mismos.

Las RDA (Recomendaciones Diarias Aconsejadas) oscilan entre 1,6-2,1 mg/día tanto para varones como para mujeres. Los requerimientos nutricionales de esta vitamina aumentan en el caso de dietas con elevado contenido proteico (por la participación activa de la vitamina en el metabolismo de los aminoácidos), durante la administración de algunos fármacos como anticonceptivos, isoniacidas y penicilamina (porque pueden interferir en el metabolismo de la vitamina B₆) y en situaciones de estrés (por el aumento de la secreción de glucocorticoides que estimula el catabolismo proteico). Se ha visto que en individuos con deficiencia en vitamina B₆, la actividad de las enzimas alanin-aminotransferasa (ALT) y aspartato-aminotransferasa (AST) está disminuida. Tiene, por tanto, una gran importancia dilucidar mediante

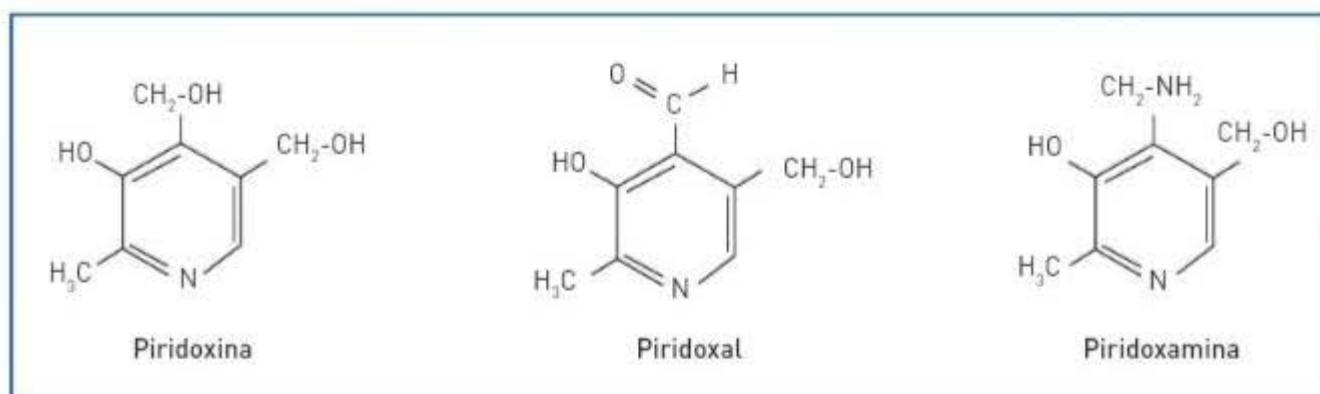


Figura P29-1. Formas en las que puede presentarse la piridoxina (vitamina B₆)

pruebas bioquímicas los estados carenciales para la vitamina B₆.

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE VITAMINA B₆

Existen varios métodos para la medición de la vitamina B₆. En la tabla P29-1 se muestran métodos tanto directos como indirectos para su determinación, así como los valores de referencia.

Para la determinación de vitamina B₆ en plasma existen varios métodos entre los que se encuentran ensayos microbiológicos y enzimáticos. La medida por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), se considera como el método más apropiado para la evaluación del estado nutricional de piridoxina, ya que permite cuantificar todas sus isoformas (vitámeros) así como el ácido 4-Piridóxico (4-PA) en un solo ensayo.

OBJETIVO

Se ha visto que en individuos con deficiencia en vitamina B₆ la actividad de las enzimas alanin-aminotransferasa (ALT) y aspartato-aminotransferasa (AST) está disminuida.

Por tanto, el objetivo de la práctica es la determinación de las actividades enzimáticas ALT y AST en el plasma sanguíneo como indicadores de los niveles de piridoxina.

PROCEDIMIENTO

Material y equipos

Muestras

- Suero.

Equipos

- Espectrofotómetro ($\lambda = 340 \text{ nm}$).
- Cubetas.
- Cronómetro.
- Baño caliente (37 °C).
- Micropipetas.

Material

- Set de reactivos líquidos para determinación de ALT (SGPT) (disponibles en varias casas comerciales).
- Set de reactivos líquidos para determinación de AST (SGOT) (disponibles en varias casas comerciales).

Determinación de la actividad alanin-aminotransferasa (ALT)

- *Reactivo:* mezclar reactivos 1 y 2 que contienen: L-alanina 500 mM, α -cetoglutarato 15 mM,

Tabla P29-1. VALORES DE REFERENCIA DE LA VITAMINA B₆ Y MÉTODOS DE DETECCIÓN

	Medida	Valor referencia
Directo	PLP en plasma	> 25 nmol/L
	Vitamina B ₆ total	> 40 nmol/L
	4-PA excretado	> 3 $\mu\text{mol/L}$
	Vitamina B ₆ total excretada	> 0,5 $\mu\text{mol/L}$
Indirecto	α -EAST	< 1,8 (< 80%)
	α -EALT	< 1,25 (< 25%)
	Excreción XA (2g L-Try)	< 65 $\mu\text{mol/día}$
	Excreción cistationina (3 g L-metionina)	< 350 $\mu\text{mol/día}$

PLP: piridoxal 5' fosfato; PA: ácido 4-piridóxico (4-PA); EAST: aspartato aminotransferasa eritrocitaria; EALT: alanino aminotransferasa eritrocitaria; XA: ácido xanturénico urinario.

LDH (microbiano) > 2.000 IU/L, NADH > 0,18 mM, Buffer 100 mM, pH 7,5 ± 0,1, ácido sódico 0,25% y estabilizantes.

Determinación de la actividad aspartato-aminotransferasa (AST)

- **Reactivo:** mezclar reactivos 1 y 2 que contienen: ácido L-aspartico > 200 mM, α-cetoglutarato 12 mM, LDH (microbiano) > 1.000 U/L, MDH (microbiano) > 800 U/L, NADH > 0,18 mM, buffer pH 7,8 ± 0,1, ácido sódico 0,25%, estabilizantes.

Protocolo

1. Lo primero que se debe realizar es preparar los reactivos de detección. Generalmente, estos reactivos se encuentran en dos botes, etiquetados como reactivo 1 y reactivo 2. Para preparar el reactivo hay que mezclar 5 partes del reactivo 1, con 1 parte del reactivo 2.
2. Posteriormente, se pipeteará 1 mL del reactivo en los tubos y se precalentará a 37 °C durante 5 minutos. Seguidamente, se deberá añadir 100 µL de la muestra, en nuestro caso suero, que se mezclará e incubará a 37 °C durante 1 minuto.
3. Después de un minuto se podrá leer la absorbancia a 340 nm tras poner un blanco. Una vez terminada la lectura, se volverá a colocar el tubo a 37 °C y se repetirán las mediciones cada minuto durante 2 minutos.

Cálculos

Lo primero es calcular el valor de la diferencia de absorbancia/minuto (ΔAbs/min).

Esta ΔAbs/min se multiplicará por el factor de corrección 1.768 dando como resultado la concentración en IU/L.

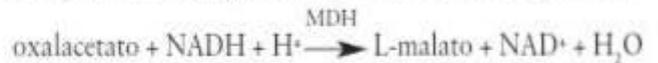
Principio de las reacciones

- ALT:



ALT cataliza la transferencia del grupo amino desde L-alanina a α-cetoglutarato dando lugar a piruvato y L-glutamato. La enzima lactato deshidrogenasa cataliza la reducción del piruvato y la oxidación simultánea de NADH a NAD. La disminución en la absorbancia es directamente proporcional a la actividad de ALT.

- AST



Aspartato-aminotransferasa cataliza la transferencia de un grupo amino desde L-aspartato a α-cetoglutarato dando oxalacetato y L-glutamato. El oxalacetato se reduce oxidándose a la vez el NADH a NAD en una reacción catalizada por la malato deshidrogenasa (MDH). La disminución en la absorbancia es directamente proporcional a la actividad de la AST. La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se añade para prevenir interferencias del piruvato endógeno que normalmente está presente en el suero.

BIBLIOGRAFÍA

- Federación española de sociedades de nutrición, alimentación y dietética (FESNAD) (2010). Ingestas dietéticas de referencia (IDR) para la población española. EUNSA. Barañáin, Navarra.
- Institute of medicine (1998). Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B₆, folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline. National Academy Press, Cop. Washington D.C.
- Spinnecker A, Sola R, Lemmen V, Castillo MJ, Pietrzik K, González-Gross M (2007). Vitamin B₆ status, deficiency and its consequences- an overview. Nutr Hosp 22(1):7-24.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se expresan en IU/L de muestra. Las unidades internacionales (IU) se definen como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto bajo unas determinadas condiciones.



COMENTARIOS

Valoración del estado nutricional en humanos a través de biomarcadores inmunológicos

S. Gómez-Martínez, L. E. Díaz Prieto, J. Romeo Marín y A. Marcos Sánchez

INTRODUCCIÓN

La valoración del estado nutricional permite identificar no sólo la desnutrición clínica severa sino también el riesgo a desarrollarla. A través de la evaluación del estado nutricional se puede detectar un estado nutricional normal, diversos grados de desnutrición (leve, moderada o severa), incluso situaciones de sobrepeso u obesidad.

Un estado nutricional inadecuado conlleva entre otras complicaciones el retraso en la cicatrización de las heridas, una menor resistencia a las infecciones o una mayor susceptibilidad a desarrollar procesos inflamatorios. De hecho, se ha observado que el estudio de la inmunidad puede ser una herramienta muy eficaz para detectar posibles situaciones de malnutrición, incluso a nivel subclínico, en cualquier grupo de población. En este capítulo se plantean varias prácticas posibles para la valoración del estado nutricional a partir de biomarcadores inmunológicos.

OBJETIVO

La evaluación del estado nutricional a partir de parámetros inmunológicos se puede llevar a cabo desde varias perspectivas, ya que los factores nutricionales (nutrientes, ingredientes, compuestos bioactivos) pueden actuar directamente sobre las células inmunocompetentes y la funcionalidad del sistema inmune.

PROCEDIMIENTO

Con la intención de dar una visión general de las distintas vías de estudio que permiten evaluar

el estado nutricional por parámetros inmunológicos a continuación se presentan varias prácticas.

PRÁCTICA 1: DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS Y CAPACIDAD FAGOCÍTICA DE LAS CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Fundamento

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Éstos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula ([Fig. P30-1](#)).

Al obligarlas a pasar alineadas una a una frente a un haz láser mediante un flujo continuo, cada célula, a la vez que dispersa la luz, emite luz fluorescente como consecuencia de la excitación láser a la que es sometida. Los parámetros que se pueden medir de forma simultánea en cada célula son:

- Dispersión frontal de la luz (proporcional al tamaño celular).
- Dispersión de la luz ortogonal (proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad de la célula).

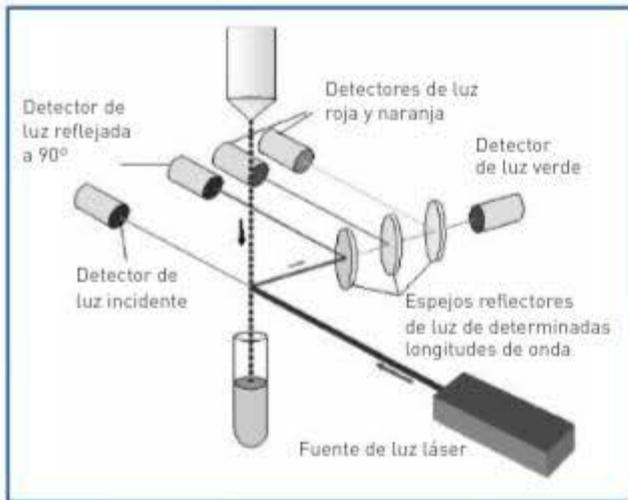


Figura P30-1. Sistema de detectores de luz en un citómetro de flujo.

- Intensidades de fluorescencia a diferentes longitudes de onda.

La citometría de flujo permite obtener información sobre poblaciones celulares a partir de un estudio individualizado de un gran número de células (habitualmente entre 5.000 y 10.000) que por tanto serán una muestra lo suficientemente representativa del conjunto poblacional (Fig. P30-2). La suspensión de células en solución isotónica se hace pasar a través de un pequeño orificio de modo que cuando salen lo hacen una a una (en fila india) formando parte de una corriente continua o flujo cilíndrico (Fig. P30-1).

Sobre esta corriente de células se hace incidir un haz de luz láser, cuya dispersión y reflexión son analizadas en duración, intensidad y espectro. La identificación de los distintos tipos de células se realiza a través de la unión de distintos anticuer-

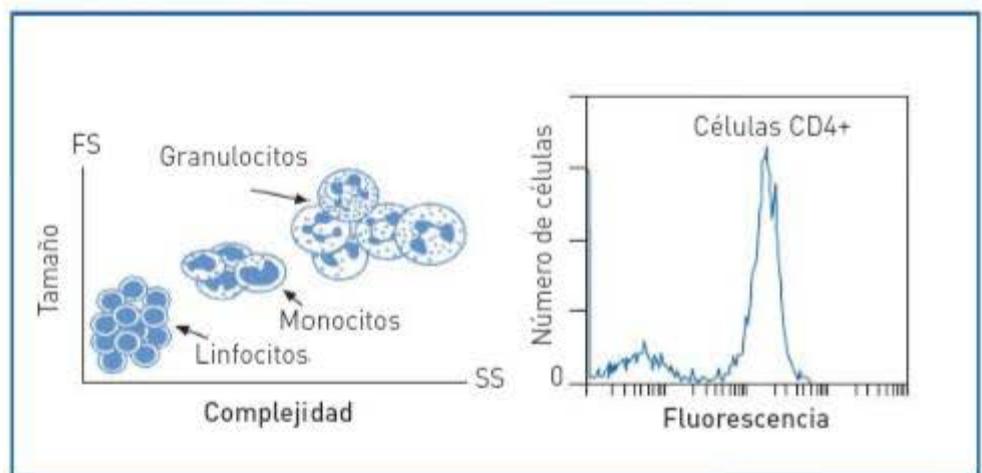
pos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos, que se unen a la superficie celular dependiendo de los receptores de membrana de cada célula a identificar. De este modo, se permite la identificación y clasificación de diferentes células tanto normales como patológicas. El isotiocianato de fluoresceína, la ficoeritrina y el PerCP son los fluorocromos más empleados en el marcaje de anticuerpos monoclonales. Todos ellos se excitan a 488 nm (luz azul) y emiten en la zona del verde, naranja y rojo, respectivamente (Fig. P30-2).

También permite determinar las variaciones de la capacidad de defensa del organismo a partir de la disminución de la capacidad fagocítica y oxidativa de las células inmunes. Esta capacidad de reacción suele estar alterada cuando el estado nutricional no es el adecuado.

El proceso de fagocitosis contiene 5 fases: quimiotaxis de la célula fagocítica, opsonización, absorción de la bacteria, formación del fagosoma, fagocitosis, y finalmente destrucción y muerte del agente extraño. Las pruebas de laboratorio utilizadas para evaluar la función fagocítica se pueden analizar en términos de los cinco pasos principales de este proceso aunque se debe indicar que no existe un análisis estándar para muchas funciones del neutrófilo; por tanto, la variedad de la elección de las pruebas depende del laboratorio. A continuación, se presentarán dos prácticas que sirven para analizar la capacidad fagocítica (*Phagotest*) y oxidativa (*Burstest*).

El *Phagotest* permite determinar cuantitativamente la actividad fagocítica de leucocitos presentes en sangre periférica (Fig. P30-3). Este test mide el porcentaje medio de monocitos y granulocitos con actividad fagocítica (implica la ingestión de

Figura P30-2. Histograma de distribución tamaño/complejidad para leucocitos.



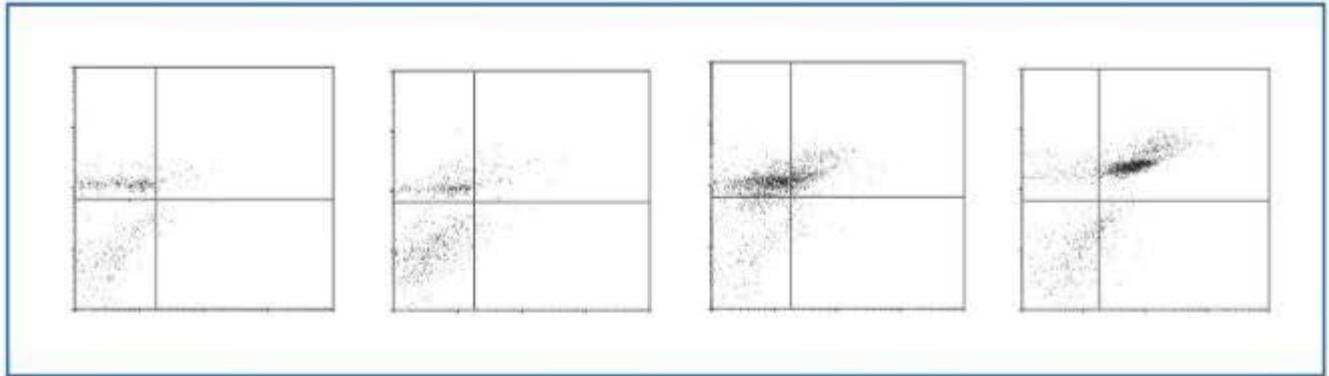


Figura P30-3. Ejemplo de un estudio de fagocitosis de izquierda a derecha, tubo control, tubo con FMLP, tubo con bacterias *E. coli* y tubo con PMA.

una o más bacterias por célula) y la actividad fagocítica específica por célula (número de bacterias fagocitadas por célula).

Burstest, permite determinar cuantitativamente la actividad respiratoria oxidativa de leucocitos presentes en sangre periférica, determinando el porcentaje de células fagocíticas que producen reactivos oxidantes y su actividad enzimática.

Material y equipos

Equipos

- Centrifuga.
- Vortex.
- Citometro de flujo.

Material

Determinación de las subpoblaciones linfocitarias

- Tubos de ensayo de poliestireno.
- Micropipeta con puntas.
- Solución lisante (10x tamponada con menos del 50% de dietilenglicol y 10% de formaldehído).
- Anticuerpo monoclonal conjugado con fluorocromo.
- Tampón de lavado (solución salina tamponada con fosfato (PBS)).

Capacidad fagocítica

- Tubos de ensayo de poliestireno.
- Micropipeta con puntas.

- Bacterias *E. coli* opsonizadas en inmunoglobulinas y complemento marcadas con fluorocromo fluoresceína.
- Solución lisente.
- Solución de parada (Quenching).
- Solución tinción de ADN.

Capacidad oxidativa

- Tubos de ensayo de poliestireno.
- Micropipeta con puntas.
- Bacterias *E. coli* opsonizadas no marcadas.
- Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA).
- Peptido quimiotáctico N-formil-met-leu-phe (fmlp).
- Dihidrorodamina (DHR)123.
- Solución lisente.
- Solución de parada (Quenching).
- Solución tinción de ADN

Protocolo

Subpoblaciones linfocitarias

1. A partir de 100 μ L de sangre entera anticoagulada en EDTA se le añade 10 μ L de anticuerpo monoclonal.
2. Se agita en un vortex 2 segundos y se incuba en oscuridad entre 30 y 45 minutos.
3. Se añade 2 mL de solución lisante, se agita en un vortex 5 segundos y se incuba 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
4. Se centrifuga a 250 g 5 minutos y se desecha el sobrenadante.
5. Sobre el pellet se añade 1 mL de solución de lavado, se agita en un vortex 5 segundos y se vuelve a centrifugar 5 minutos a 250 g.

6. Se desecha otra vez el sobrenadante y se resuspende el pellet en 0,5 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS).
7. Se mezcla y ya está listo para realizar la lectura en el citómetro.

Capacidad fagocítica

1. Se incuban 50 μ L de sangre heparinizada durante 10 minutos con 20 μ L de bacterias *E. coli* a 37 °C y otros 50 μ L de sangre heparinizada se ponen en hielo (control negativo).
2. El tubo con sangre y bacterias *E. coli* se pone en hielo 2 o 3 minutos.
3. Se le añade 50 μ L de solución de parada (Quenching). Se agita con vortex 5 segundos.
4. Se añaden 2 mL de solución de lavado (Washing).
5. Se centrifuga 5 minutos a 250 g y se descarta el sobrenadante.
6. Se repite el proceso de lavado otra vez.
7. Se añade 1 mL de solución lisante y se incuba 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
8. Se centrifuga 5 minutos a 250 g.
9. Se repite el proceso de lavado.
10. Se añaden 100 μ L de yoduro de propidio y se mantiene a 0 °C durante 15 minutos.
11. Se analiza en el citómetro.

Capacidad oxidativa

1. Se ponen en hielo durante 15 minutos 4 tubos de 50 μ L de sangre heparinizada.
2. Un tubo control se mantiene en el hielo mientras se incuba el resto con 20 μ L de bacterias *E. coli* opsonizadas, 10 μ L forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y 10 μ L del péptido quimioatóxico N-formil-met-leu-phe (fmlp) a 37 °C durante 10 minutos.
3. Se añaden 20 μ L dihidrorodamina (DHR)123 como sustrato fluorogénico y se incuba 10 minutos a 37 °C.
4. Se añade 1 mL de solución lisante y se incuba 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
5. Se centrifuga 5 minutos a 250 g. Se repite el proceso de lavado.
6. Se añaden 100 μ L de yoduro de propidio y se mantiene a 0 °C durante 15 minutos.
7. Se analiza en el citómetro.

PRÁCTICA 2. TEST DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA

Fundamento

La respuesta de hipersensibilidad de tipo IV, es una respuesta inmune mediada por los linfocitos T. La respuesta se inicia por los linfocitos T activados por antígeno sensibilizados. Incluye las reacciones de hipersensibilidad retardada mediada por células T CD4+ y la citotoxicidad celular directa mediada por células T CD8+. Este tipo de respuesta se da no sólo ante una variedad de agentes microbianos, sino también contra muchos virus, hongos protozoos y parásitos. El objetivo de esta práctica consiste en valorar la respuesta inmune celular *in vivo* de tipo IV, respuesta inmune mediada por los linfocitos T, mediante el uso de Multitest.

Material y equipos

- Alcohol.
- Algodón.
- Multitest.

Protocolo

1. El Multitest debe ser aplicado sobre piel sana (Fig. P30-4). Se retira la película protectora adherente, se limpia con alcohol el lugar de la aplicación, que generalmente es la cara anterior del antebrazo y se quitan los capuchones protectores de cada cabeza precargada.
2. Sujetando el antebrazo estirando la piel, se orienta la parte en T del Multitest hacia la cabeza del sujeto (Fig. P30-3) y se apoya firmemente ejerciendo una presión homogénea de las 8 cabezas sobre la piel.
3. La lectura se practica a las 48 horas con ayuda de una escala graduada de precisión milimétrica. Se comprueba por palpación la induración y se delimita su periferia con un bolígrafo o un lápiz dermatográfico, teniendo en cuenta que en ningún caso se debe tomar en consideración un eritema solo. A continuación se miden los diámetros a y b de induración en mm. Calcular el diámetro medio (*score*) de la siguiente manera $(a + b/2)$ (Fig. P30-4).

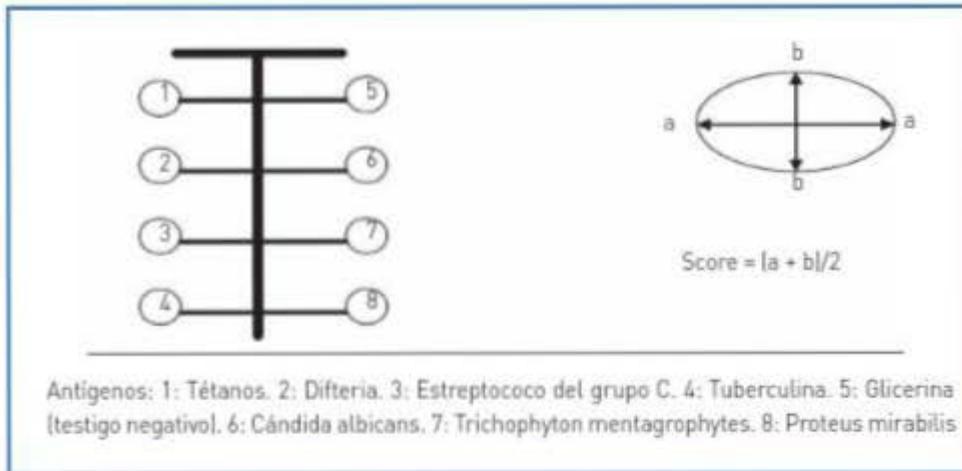


Figura P30-4. Sistema Multitest, distribución de antígenos y cálculo del score.

PRÁCTICA 3. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTE DE CULTIVO DE LINFOCITOS

Fundamento

La técnica de ELISA se basa en la unión específica de la citoquina contenida en la muestra a anticuerpos monoclonales específicos inmovilizados sobre la superficie de placas de titulación. El objetivo de esta práctica consiste en determinar los niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivos de linfocitos o en sueros mediante la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

Material y equipos

Equipos

- Lector de absorbancia.
- Vortex.
- Sonicador.
- Agitador orbital de placas.

Material

- Pipetas automáticas de 25-1.000 μL y multicanal (8 canales).
- Tubos de centrifuga de polipropileno.
- Estándares y controles.
- Anticuerpos anti-IL-1 β , anti-IL-6, anti-TNF- α .
- Estreptavidina-HRP (*Horseradish peroxidase conjugate*).

- Tetrametilbencidina (TMB).
- Buffer de ensayo y de lavado.
- Placa de 96 pocillos.

Protocolo

1. La determinación de los niveles de citoquinas puede realizarse en suero o en sobrenadante de cultivo de linfocitos con estimulación por mitógeno.
2. Incubación de muestras y estándares en placas de 96 pocillos para unir antígeno a determinar (IL-1 β , IL-6 TNF- α) a los anticuerpos fijados al pocillo.
3. Adicionar segundo anticuerpo monoclonal anticitoquina conjugado con biotina.
4. Lavados repetidos con solución buffer para eliminar el segundo anticuerpo no unido.
5. Incubar en presencia de un conjugado estreptavidina-HRP que se unirá al conjugado de biotina.
6. Lavados repetidos con solución buffer para eliminar la estreptavidina-HRP no unida y se añade una solución de TMB que sirve de sustrato a la HRP.
7. La reacción se detiene mediante la adición de una solución de detención y se mide la absorbancia a 450 nm.

BIBLIOGRAFÍA

- García-Rodríguez JA, Picazo JJ (2007). Compendio de Microbiología Médica. García-Rodríguez JA, Picazo JJ (eds.). Elsevier, España.

Jaurritea E, Sitges-Serra A, Sanchez JM y Sitges-Creus A (1981). Desnutrición e inmunodepresión preoperatorias: factor de riesgo en cirugía mayor. Estudio preliminar. *Cir Esp* 35:81.

Sampedro A, De los Toyos JR, Martínez-Nistal A (1995). Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría. Universidad de Oviedo, Oviedo.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Práctica 1. Determinación de subpoblaciones linfocitarias y capacidad fagocítica de las células inmunocompetentes por citometría de flujo

Los resultados analizados en el citómetro se pueden presentar en:

- Histogramas.
- Gráfico de puntos (Dot Plot).
- Gráfico de contorno (Contour Plot).
- Gráfico isométrico (3D).
- Gráfico de densidad (Density Plot).

Cada una de estas representaciones permite reconocer la población de estudio dependiendo de su tamaño, complejidad y fluorescencia y extraer valores porcentuales de dichas poblaciones en la muestra total. Una vez se tienen estos porcentajes se calcula el número de células total en el individuo a partir de los datos de linfocitos que han sido calculados con anterioridad en un hemograma de control.

En cuanto a los resultados que se pueden extraer de la capacidad fagocítica y oxidativa a partir de los resultados del citómetro se puede llegar a determinar cuantitativamente el número de células capaces de ingerir bacterias y la actividad específica por célula (número de bacterias internalizadas) a la vez que se puede conocer tanto cuantitativamente como cualitativamente resultados del proceso conocido como estallido respiratorio ([Fig. P30-4](#)).

Práctica 2. Test de hipersensibilidad retardada

Los resultados serán presentados cualitativamente por el *Score* de la siguiente forma:

- *Score* = 0 respuesta anérgica.
- *Score* = 0-5 mm para mujeres o 0-10 mm para hombres: hipoergia.
- *Score* = 5-10 mm para mujeres o 10-20 mm para hombres: respuesta baja.
- *Score* > 10 mm para mujeres o > 20 mm para hombres: respuesta normal.

Criterios de valoración de respuestas definidos por Jaurrieta y col. (1981) para la población española.

Práctica 3. Determinación de citoquinas en sobrenadante de cultivo de linfocitos

Se prepara una curva estándar a partir de las concentraciones conocidas (estándares) de citoquina utilizada y se determina la concentración de la muestra a partir de la absorbancia medida (p.ej., concentración para IL-6 = 400 pg/mL) ([Fig. P30-5](#)).

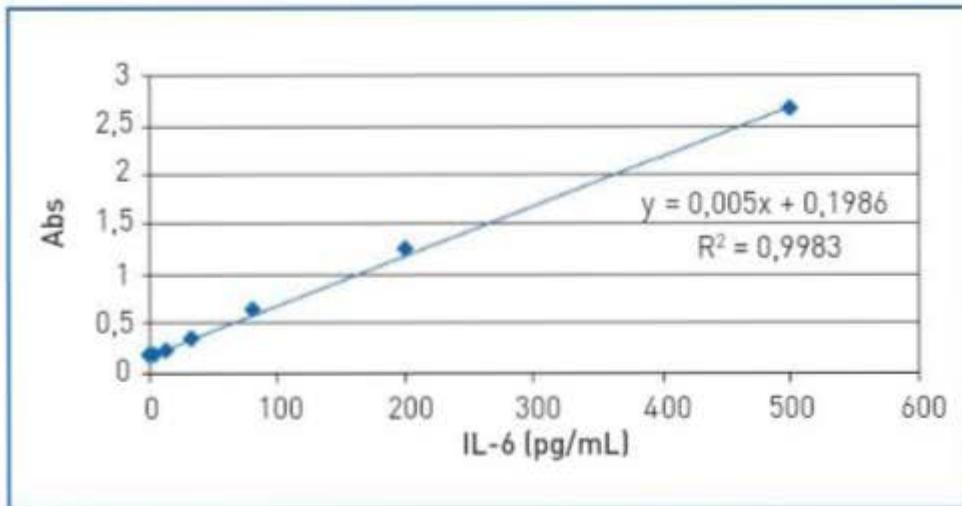


Figura P30-5. Ejemplo de gráfico lineal de absorbanza vs concentración del estándar.

COMENTARIOS



Evaluación bioquímica del estado nutritivo con métodos de diagnóstico rápido

M. A. Zulet Alzórriz, I. Abete Goñi y J. A. Martínez Hernández

INTRODUCCIÓN

La necesidad de autocontrol y seguimiento de determinadas enfermedades, así como la sensibilización a la población en materia de salud y prevención, ha llevado al desarrollo de equipos que permiten de una forma práctica, rápida y eficaz, identificar y controlar determinados factores de riesgo de enfermedad, tales como el colesterol y los triglicéridos en las dislipemias y la glucemia y los cuerpos cetónicos en la diabetes.

La detección precoz es fundamental como primera medida para la prevención de las complicaciones asociadas, por ello en muchas campañas promovidas con este fin se cuenta con este tipo de tecnología que permite con fiabilidad y en breve espacio de tiempo identificar parámetros alterados. Igualmente, los equipos de diagnóstico rápido están disponibles en farmacias para una mejor atención farmacéutica, en consultas dietéticas para control de la eficacia y cumplimiento de la pauta dietética instaurada, así como en centros de enseñanza para familiarizar al alumno con su manejo e interpretación. En este sentido, los análisis bioquímicos de diagnóstico rápido se llevan a cabo habitualmente en sangre capilar y en orina.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica consiste en llevar a cabo determinaciones en sangre capilar y orina con métodos de diagnóstico rápido, para su posterior interpretación.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

El procedimiento a seguir en el caso de utilización de equipos de autocontrol portátiles en sangre capilar depende de la casa comercial proveedora. No obstante, en el protocolo se recogen generalidades acerca de la utilización de diversos equipos.

Material y reactivos

Equipos

Equipos para análisis en sangre:

- Analizadores automáticos de química seca con tiras monoparamétricas en sangre capilar, total, suero o plasma.
- Lanceta estéril.
- Dispositivo de punción (pinchador).
- Tira reactiva (específica para cada aparato).
- Contenedor de desechos apto para eliminar tiras reactivas.
- Contenedor de desechos apto para material punzante (lancetas).

Equipos para análisis en orina:

- Tiras reactivas colorimétricas para la lectura visual de parámetros bioquímicos en muestras de orina.
- Analizadores de orina semiautomáticos.
- Tubo estéril recolección orina.

- Test para la detección simultánea cualitativa de múltiples drogas y metabolitos en muestras de orina humana.

Protocolo

Equipos de autocontrol portátiles en sangre capilar

1. La mayoría de los equipos contemplan el análisis de colesterol, triglicéridos, glucosa, cuerpos cetónicos y/o lactato mediante tiras reactivas. Algunos de ellos no requieren calibración para el usuario (autocalibrado) y tienen la posibilidad de incorporar evento posprandial, hora de ingesta y tiempo transcurrido desde la ingesta.
2. La toma de muestra es por capilaridad y el volumen requerido es pequeño (μL). El lugar para ejecutar la punción es habitualmente la yema de los dedos. El uso de zonas de punción alternativas debe siempre ser consultado con el profesional sanitario, ya que muestras obtenidas en otras zonas, pueden sufrir diferencias respecto a las muestras obtenidas en el dedo, por lo que deberá ser correctamente informado.
3. Para la obtención de la gota de sangre se utiliza una lanceta estéril ultrafina metálica compatible con los principales dispositivos de punción del mercado y que garantiza la punción capilar prácticamente indolora. El dispositivo de punción ofrece la posibilidad de seleccionar la profundidad de penetración de la lanceta a diferentes niveles y la fuerza del muelle. Algunos pinchadores incluyen un adaptador para punciones alternativas (antebrazo).
4. Para facilitar la formación de una buena gota de sangre es conveniente masajear el dedo en dirección al lugar de punción. En ese momento se aproxima la tira reactiva, la cual absorbe la gota de sangre por capilaridad. Los equipos suelen incorporar un sonido acústico que indica que se puede retirar la tira y esperar al análisis. Los resultados aparecen en pantalla.
5. La obtención de resultados es en tiempo breve (5 segundos aproximadamente). Existe la posibilidad de avisador alarma para el control de la medición a determinadas horas. Además, disponen de memoria para almacenar mediciones diferentes con fecha y hora.

6. Diversos aparatos incluyen o adaptan impresora o también ofrecen la posibilidad de conexión, permitiendo la impresión de los resultados. Igualmente algunos aparatos se acompañan de un programa informático que permite realizar gráficos de seguimiento de datos en un período de tiempo, realizar informes, etc.
7. Los equipos utilizados deben garantizar la correlación de resultados con los análisis estándar de laboratorio.

Equipos para urianálisis

1. Existe la opción tradicional de utilizar tiras reactivas colorimétricas para lectura visual. El procedimiento a seguir se basa en sumergir la tira en la muestra de orina de primera hora de la mañana previamente recolectada en tubo estéril. La determinación se realiza por comparación de la tira reactiva con la escala de colores impresa en el envase.
2. Los parámetros que se analizan comprenden: proteínas, leucocitos, cuerpos cetónicos, glucosa, bilirrubina, urobilinógeno, sangre, nitritos, pH, densidad y ácido ascórbico.
3. Actualmente existe la posibilidad de utilizar analizadores de orina semiautomáticos que son fáciles de usar, rápidos (60-90 segundos) y garantizan fiabilidad de lectura. Algunos equipos incluyen programa informático para gestión de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- American Diabetes Association (2007). Recommendations and Interventions for Diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 30(1):548-65.
- Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III) (2001). *JAMA* 285:2486-97.
- Mataix V, Matas A (2009). Evaluación bioquímica del estado nutricional. En "Nutrición y alimentación humana. Tomo I: Nutrientes y alimentos", pp. 1.033-1.046. (2.ª ed.). Mataix J. Ediciones Ergon, Madrid.
- Jacques W (2008). Interpretación clínica de pruebas diagnósticas. (8.ª ed.). Lippincott Williams and Wilkins, Barcelona.
- King S, Schaub M (2010). Análisis de orina y de los líquidos corporales. (5.ª ed.). Panamericana, Madrid.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

ANALÍTICA EN SANGRE

Parámetros	Medición	Deseable	Límite alto
Glucemia ayunas		< 5,5 mmol/L (70-99 mg/dL)	5,6-6,9 mmol/l* (100-125 mg/dL)
Cuerpos cetónicos			
Colesterol		< 5,1 mmol/L (200 mg/dL)	5,1-6,1 mmol/L (200-239 mg/dL)
Triglicéridos ayunas		< 1,7 mmol/L (150 mg/dL)	1,7-2,24 mmol/L (150-199 mg/dL)

* Glucemia en ayunas alterada (prediabetes); $\geq 7,0$ mmol/L (126 mg/dL) diagnóstico de diabetes

ANALÍTICA EN ORINA

Parámetro	Positivo/Negativo/Valor	Posibles causas de la alteración
Glucosa		Glucosuria: Diabetes mellitus Renal Embarazo Alimentaria
Proteínas		Proteinuria: Enfermedad renal Nefropatía diabética
Bilirrubina		Ictericia Hepatitis aguda Hepatitis crónica
Urobilinógeno		Enfermedad hepática Enfermedad hemolítica Obstrucción biliar

ANALÍTICA EN ORINA		
Parámetro	Positivo/Negativo/Valor	Posibles causas de la alteración
pH		<p>Orina ácida (pH < 7):</p> <ul style="list-style-type: none"> Cetosis diabética Diabetes mellitus Acidosis respiratoria Diarreas Uremia Dieta hiperproteica Vómitos Gota Fallo renal <p>Orina alcalina (pH > 7):</p> <ul style="list-style-type: none"> Hiperventilación Alcalosis metabólica Dietas ricas en vegetales y lácticos
Densidad		<ul style="list-style-type: none"> Glomerulonefritis y pielonefritis Insuficiencia adrenal Fallo cardíaco
Sangre		<p>Hematuria:</p> <ul style="list-style-type: none"> Cálculos Tumores Glomerulonefritis Pielonefritis Cistitis
Cuerpos cetónicos		<p>Cetonuria:</p> <ul style="list-style-type: none"> Descompensación metabólica Diabetes mellitus Estados de inanición Algunas dietas de adelgazamiento Estados febriles
Nitritos		<p>Bacteriuria:</p> <ul style="list-style-type: none"> Pielonefritis

**COMENTARIOS**

A large, empty light blue rectangular area intended for writing comments or notes.

32. Cálculo del gasto energético total y valoración de la actividad física
33. Encuestas dietéticas de valoración de la ingesta individual
34. Cuestionarios de evaluación rápida del estado nutricional. *Mini Nutritional Assessment (MNA)*
35. Empleo de listas de intercambio para enfermos renales
36. Adaptación y aplicación del cuestionario de conducta de alimentación infantil CEBQ

Cálculo del gasto energético total y valoración de la actividad física

H. H. M. Hermsdorff, I. Labayen Goñi y A. Fernández-Quintela

INTRODUCCIÓN

El gasto energético total (GET) se obtiene de la suma de tres componentes: a) el gasto energético en reposo (GER), b) el efecto termogénico de los alimentos y c) el gasto derivado de la actividad física (AF). Cada uno de estos tres componentes es altamente variable y es precisamente esta variabilidad la que determina las diferencias en el gasto energético diario de los individuos.

El GET se puede medir objetivamente (calorimetría directa e indirecta y método del agua doblemente marcada) o se puede estimar por extrapolación a partir de medidas antropométricas, cuya ventaja reside en su mayor accesibilidad y menor coste. Los métodos objetivos ya han sido parcialmente revisados en otro capítulo de esta obra; en este capítulo nos centraremos en la utilización de las herramientas disponibles para la estimación indirecta del GET.

OBJETIVO

El objetivo de esta sesión consiste en determinar el GET de individuos de diferentes grupos de edad o en situaciones fisiológicas diferentes, por estimación indirecta, con el empleo de fórmulas y tablas de referencia.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Las herramientas disponibles nos permitirán estimar el GET para cada grupo de edad y situa-

ción fisiológica concreta. Como norma, se debe indicar que una herramienta es tanto más precisa cuanto mayor sea el número de variables que incluya en su definición.

En este sentido, las mayoría de las fórmulas y tablas de referencia para la estimación del GET están basadas en la técnica de dilución isotópica (agua doblemente marcado) o en la medida de la frecuencia cardíaca. A partir de estos métodos, los valores de GET (kcal/día) incluyen el coste metabólico basal, el efecto termogénico de los alimentos, el coste para el *turnover* de tejidos y el coste derivado de la actividad física. En lactantes, niños, adolescentes y durante el embarazo y lactancia, se tiene en cuenta además un coste energético adicional, debido al crecimiento, ganancia de peso y producción de leche, respectivamente. El efecto energético de los alimentos supone entre un 7% y un 10% del gasto energético total.

Niños y adolescentes: las necesidades energéticas en la infancia y la adolescencia son difíciles de establecer debido a las importantes diferencias interindividuales relacionadas, sobre todo, con el ritmo de crecimiento y con el grado variable de actividad física. El cálculo del GET en cada una de las etapas de este período incluye un componente derivado del gasto energético del crecimiento somático. En el caso de los lactantes, el coste energético derivado del crecimiento puede variar desde un 40% del GET en el primer mes, hasta un 3% en el segundo año de vida; el coste energético debido a la actividad física, por el contrario, es muy pequeño en el recién nacido y va aumentando progresivamente. Por otra parte, el gasto energético en reposo depende fundamentalmente de los tejidos libres de grasa, por lo que los cambios en la composición corporal originados en ambos se-

Tabla P32-1. CÁLCULO DEL GASTO ENERGÉTICO TOTAL (GET) EN LACTANTES

Lactantes	FAO/WHO/UNU (2001) Gasto (kcal/kg/día)	Gasto (kJ/kg/día)
0 mes	110	460
1 mes	102	430
2 meses	95	395
3 meses	83	345
4 meses	82	345
5 meses	81	340
6-9 meses	79	330
10-12 meses	80	335
Institute of Medicine (2001)		
0-3 meses	GET (kcal/día) = 89 × Peso (kg) - 100 + 175	
4-6 meses	GET (kcal/día) = 89 × Peso (kg) - 100 + 56	
7-12 meses	GET (kcal/día) = 89 × Peso (kg) - 100 + 22	
13 meses-3 años	GET (kcal/día) = 89 × Peso (kg) - 100 + 20	
Butte (2005)		
Para todos los bebés	<i>Países desarrollados</i> GET (kcal/día) = 88,6 × Peso (kg) - 99,4 GET (kJ/día) = 371 × Peso (kg) - 416 <i>Países en vías de desarrollo</i> GET (kcal/día) = 95,0 × Peso (kg) - 126 GET (kJ/día) = 397 × Peso (kg) - 527	
Para bebés alimentados con leche materna	GET (kcal/día) = 92,8 × Peso (kg) - 152 GET (kJ/día) = 388 × Peso (kg) - 635	
Para bebés alimentados con fórmula láctea	GET (kcal/día) = 82,6 × Peso (kg) - 29,0 GET (kJ/día) = 346 × Peso (kg) - 122	

xos durante la maduración van a tener una repercusión importante sobre los requerimientos nutritivos.

Embarazo y lactancia: el coste energético en el embarazo está determinado por la energía necesaria para la ganancia de peso gestacional, asociada con la deposición proteica y de grasa en los tejidos maternos, fetal y placentario, así como por el aumento en el GER de la madre. A su vez, las

necesidades energéticas de la mujer durante la lactancia están definidas como el gasto energético para el mantenimiento del peso y composición corporales, así como el coste energético derivado de la producción y secreción de la leche materna.

Ancianos: el GET desciende en esta etapa de la vida debido tanto al descenso del GER (1-3% por década), como a la disminución de la actividad física.

Tabla P32-2. CÁLCULO DEL GASTO ENERGÉTICO TOTAL (GET) O DEL GASTO ENERGÉTICO EN REPOSO (GER) EN NIÑOS Y ADOLESCENTES

Niños y adolescentes	Fórmulas diseñadas según edad y sexo Schöfield (1985)	FAO/WHO/UNU (1985, 2001)
< 3 años		
Niños	GET (kcal/día) = $0,167 \times \text{peso (kg)} + 1,517 \times \text{Longitud/Talla (m)} - 618$ GET (MJ/día) = $0,0007 \times \text{peso (kg)} + 6,349 \times \text{Longitud/Talla (m)} - 2,584$	GER (kcal/día) = $60,9 \times \text{peso (kg)} - 54$ GER (MJ/ día) = $0,249 \times \text{peso (kg)} - 0,127$
Niñas	GET (kcal/día) = $16,25 \times \text{peso (kg)} + 1,023 \times \text{Longitud/Talla (m)} - 413,5$ GET (MJ/día) = $0,068 \times \text{peso (kg)} + 4,281 \times \text{Longitud/Talla (m)} - 1,730$	GER (kcal/día) = $61 \times \text{peso (kg)} - 51$ GER (MJ/ día) = $0,244 \times \text{peso (kg)} - 0,130$
3-10 años		
Niños	GER (kcal/día) = $19,6 \times \text{peso (kg)} + 1,31 \times \text{altura (m)} + 366$ GER (MJ/día) = $0,082 \times \text{peso (kg)} + 0,545 \times \text{altura (m)} + 1,736$	GER (kcal/día) = $22,7 \times \text{peso (kg)} + 495$ GER (MJ/ día) = $0,095 \times \text{peso (kg)} + 2,110$
Niñas	GER (kcal/día) = $16,97 \times \text{peso (kg)} + 1,62 \times \text{altura (m)} + 371,2$ GER (MJ/día) = $0,071 \times \text{peso (kg)} + 0,677 \times \text{altura (m)} + 1,533$	GER (kcal/día) = $22,4 \times \text{peso (kg)} + 499$ GER (MJ/ día) = $0,085 \times \text{peso (kg)} + 2,033$
10-18 años		
Niños	GER (kcal/día) = $16,25 \times \text{peso (kg)} + 1,37 \times \text{altura (m)} + 515,5$ GER (MJ/día) = $0,068 \times \text{peso (kg)} + 0,574 \times \text{altura (m)} + 2,157$	GER (kcal/día) = $17,5 \times \text{peso (kg)} + 651$ GER (MJ/ día) = $0,074 \times \text{peso (kg)} + 2,754$
Niñas	GER (kcal/día) = $8,365 \times \text{peso (kg)} + 1,466 \times \text{altura (m)} + 200$ GER (MJ/día) = $0,035 \times \text{peso (kg)} + 1,948 \times \text{altura (m)} + 0,837$	GER (kcal/día) = $12,2 \times \text{peso (kg)} + 746$ GER (MJ/ día) = $0,056 \times \text{peso (kg)} + 2,898$

Tabla P32-3. CÁLCULO DEL GASTO ENERGÉTICO EN REPOSO (GER) EN ADULTOS Y ANCIANOS*

Adultos y ancianos	Fórmulas específicamente diseñadas
	Harris-Benedict (1919)
Hombres	$GER \text{ (kcal/día)} = 66,47 + 13,75 \times \text{Peso (kg)} + 5,0 \times \text{Altura (cm)} - 6,75 \times \text{Edad (años)}$
Mujeres	$GER \text{ (kcal/día)} = 655,09 + 9,56 \times \text{Peso (kg)} + 1,84 \times \text{Altura (cm)} - 4,67 \times \text{Edad (años)}$
	Owen (1986-1987)
Hombres	$GER \text{ (kcal/día)} = 879 + 10,2 \times \text{Peso (kg)}$
Mujeres	$GER \text{ (kcal/día)} = 795 + 7,18 \times \text{Peso (kg)}$
	Mifflin-St Jeor (1990)
Hombres	$GER \text{ (kcal/día)} = 9,99 \times \text{Peso (kg)} + 6,25 \times \text{Altura (cm)} - 4,92 \times \text{Edad (años)} + 5$
Mujeres	$GER \text{ (kcal/día)} = 9,99 \times \text{Peso (kg)} + 6,25 \times \text{Altura (cm)} - 4,92 \times \text{Edad (años)} - 161$
	FAO/WHO/UNU (1985, 2001)
Hombres	
18-30 años	$GER \text{ (kcal/día)} = 15,3 \times \text{Peso (kg)} + 679$ $GER \text{ (MJ/día)} = 0,063 \times \text{Peso (kg)} + 2,896$
31-60 años	$GER \text{ (kcal/día)} = 11,6 \times \text{Peso (kg)} + 879$ $GER \text{ (MJ/día)} = 0,048 \times \text{Peso (kg)} + 3,653$
> 60 años	$GER \text{ (kcal/día)} = 13,5 \times \text{Peso (kg)} + 487$ $GER \text{ (MJ/día)} = 0,049 \times \text{Peso (kg)} + 2,459$
Mujeres	
18-30 años	$GER \text{ (kcal/día)} = 14,7 \times \text{Peso (kg)} + 496$ $GER \text{ (MJ/día)} = 0,062 \times \text{Peso (kg)} + 2,036$
31-60 años	$GER \text{ (kcal/día)} = 8,7 \times \text{Peso (kg)} + 829$ $GER \text{ (MJ/día)} = 0,034 \times \text{Peso (kg)} + 3,538$
> 60 años	$GER \text{ (kcal/día)} = 10,5 \times \text{Peso (kg)} + 596$ $GER \text{ (MJ/día)} = 0,038 \times \text{Peso (kg)} + 2,755$
	Estimación rápida
Hombres	$GER \text{ (kcal/día)} = 1,0 \text{ kcal/hora} \times \text{Peso (kg)}$ $GER \text{ (MJ/día)} = 0,4187 \text{ MJ/hora} \times \text{Peso (kg)}$
Mujeres	$GER \text{ (kcal/día)} = 1,0 \text{ kcal/hora} \times \text{Peso (kg)}$ $GER \text{ (MJ/día)} = 0,3768 \text{ MJ/hora} \times \text{Peso (kg)}$

*Para el cálculo de GER para ancianos son utilizadas las ecuaciones de la FAO/WHO/UNU, correspondientes para la edad y las ecuaciones de Harris-Benedict.

Tabla P32-4. CATEGORÍAS DE DISTINTAS ACTIVIDADES Y SU FACTOR CORRESPONDIENTE (FAO/WHO/UNU, 2001)

Actividad	Factor corrector*
Reposo Sueño, tumbado.	1,0
Sedentaria o ligera Actividades en posición sentada y de pie (leer, escribir, usar el ordenador, ver la televisión, hablar, escuchar música), oficinistas, abogados, médicos, estudiantes, dependientas de comercio, maestros, jubilados, parados, trabajos de laboratorio, secretarías, amas de casa y profesiones similares).	1,55
Activa o moderada Actividades como practicar el <i>footing</i> , ciclismo, tenis, bailar, y otros deportes aeróbicos, gimnasio.	1,75
Muy activa o intensa Caminar con carga, cortar árboles, cavar y otros trabajos en el campo no mecanizados, fútbol, squash, rugby.	2,10

*Los factores que se presentan incluyen el gasto por la actividad física y el efecto termogénico de los alimentos.

Tabla P32-5. CÁLCULO DEL GASTO ENERGÉTICO TOTAL (GET) EN EL EMBARAZO Y EN LA LACTANCIA (FAO/WHO/UNU, 2001)

Embarazo		
Primer trimestre	GET (kcal/día) = GET	+ 0 kcal
Segundo trimestre	GET (kcal/día) = GET	+ 360 kcal
Tercer trimestre	GET (kcal/día) = GET	+ 475 kcal
Lactancia en los primeros seis meses		
Madre con ganancia de peso satisfactoria en el embarazo	GET (kcal/día) = GET	+ 505 kcal
Madre con ganancia de peso insuficiente en el embarazo	GET (kcal/día) = GET	+ 675 kcal

Además, el GET se puede estimar por cálculos factoriales basados en las actividades realizadas durante las 24 horas y el coste energético de las mismas.

Situaciones especiales: la determinación de las necesidades energéticas de los individuos con enfermedades agudas o crónicas es más compleja que en el estado de salud, pues depende del factor de estrés de la propia enfermedad, del nivel de inactividad física o movilidad del paciente, del tratamiento y del estado nutricional del sujeto.

Material

Se utilizarán fórmulas y tablas, propuestas por diversas Instituciones, Comités de expertos o autores.

Protocolo

1. El primer método de determinación del GET, aplicable a los lactantes, es el que utiliza el peso y el tipo de la lactancia recibida como variables

Tabla P32-6. GASTO ENERGÉTICO EN FUNCIÓN DE DISTINTAS ACTIVIDADES INDIVIDUALES PARA ADULTOS

Actividad	Gasto (kcal/kg/min)	Actividad	Gasto (kcal/kg/min)
Ligera		Intensa	
Dormir	0,017	Jardinería	0,086
Estar tumbado	0,017	Bádminton	0,087
Estar sentado	0,018	Albañilería	0,093
Estar de pie	0,019	Correr (7,0 km/h)	0,097
Leer	0,018	Segar y arar	0,098
Estudiar	0,020	Ciclismo (14 km/h)	0,100
Ver TV	0,025	Tenis	0,104
Comer	0,025	Aerobic	0,104
Coser a máquina	0,025	Nadar a braza	0,106
Mecanografiar	0,026	Cortar leña	0,110
Conversar	0,027	Minería	0,110
Escribir	0,029	Karate o judo	0,113
Ducharse	0,030	Patinaje	0,118
Barrer	0,031	Escalada (sin pesos)	0,120
Lavar platos	0,037	Vóleybol	0,120
Pasear	0,038	Correr (7,5 km/h)	0,121
Tocar piano	0,038		
Pescar	0,038		
Cocinar	0,045		
Caminar (3,6 km/h)	0,051		
Moderada		Muy intensa	
Carpintería	0,052	Correr (8,2 km/h)	0,138
Herrería	0,052	Boxeo (no profesional)	0,139
Metalurgia	0,052	Hockey	0,139
Usar cortacésped	0,052	Baloncesto	0,140
Frisbee	0,052	Subir escaleras	0,154
Equitación	0,052	Nadar a crawl	0,156
Surfear	0,052	Fútbol	0,157
Tenis de mesa	0,057	Ciclismo (20 km/h)	0,160
Gimnasio	0,059	Correr (9,5 km/h)	0,167
Fregar el suelo	0,060	Esquí	0,174
Limpia ventanas	0,061	Balónmano	0,174
Mecánica	0,061	Cargar troncos	0,174
Ciclismo (8 km/h)	0,064	Buceo	0,205
Caminar (5,1 km/h)	0,069	Boxeo (profesional)	0,209
Lavar ropa (manual)	0,070	Salto con cuerda	0,209
Remar	0,075	Squash	0,209
Golf	0,079		

- (Tabla P32-1), dado que el coste energético por AF es muy pequeño en este rango de edad.
- El segundo método de determinación del GET es el que utiliza el GER y el gasto energético derivado de la AF.

Se calculará primero el GER, de acuerdo con el sexo y la edad. Las tablas P32-2 y P32-3 presentan las fórmulas más utilizadas para niños y adolescentes y adultos y ancianos, respectivamente. Posteriormente, se determinará el

Tabla P32-7. FACTORES CORRECTORES DEL GASTO ENERGÉTICO EN SITUACIONES ESPECIALES PARA ENFERMOS U HOSPITALIZADOS*

	Factor corrector
Actividad física	
Reposo en cama	1,2
Movimientos en la cama	1,25
Ambulatorio	1,3
Situación especial o enfermedad diagnosticada	
Cirugía menor	1,2
Cáncer	1,3
<i>Infección</i>	
Leve	1,1
Moderada	1,3
Severa	1,4
Sepsis mayor	1,6
Peritonitis	1,4
<i>Traumatismo</i>	
Esquelético	1,4
Cabeza (comatoso)	1,4
(terapia con esteroides)	1,6
Traumatismo múltiple	1,5
Traumatismo + Sepsis	1,6
<i>Quemadura</i>	
0-20 %	1,1-1,5
20-30 %	1,6
30-50 %	1,7
50-70 %	1,8
70-90 %	2,0
<i>Factor térmico</i>	
Por cada grado de temperatura por encima de los 37 °C	1,13

*Aplicables en adultos y ancianos.

P32-4). Finalmente, se multiplica este factor por el GER para determinar el GET. Estos factores incluyen el gasto por la actividad física y el efecto termogénico de los alimentos. A los niños hasta los 10 años de edad se les considera como activos.

En las situaciones fisiológicas de embarazo o lactancia, la ingesta calórica de la mujer se calculará mediante la suma entre el GET (GER correspondiente a la edad y factor de AF) más un factor que depende del período gestacional en que se encuentre (Tabla P32-5).

- Un tercer método, que se aplica en adultos sanos, es aquél que cuantifica de forma más precisa la actividad física diaria y que además tiene en cuenta el peso del individuo (Tabla P32-6).
- En el caso de pacientes hospitalizados o enfermos se tendrá en cuenta un factor corrector del coste energético que depende del tipo de agresión o lesión.

Se calculará primero el GER, de acuerdo con el sexo, mediante la ecuación de Harris-Benedict (Tabla P32-3). Posteriormente, se determinará el factor de AF adecuado, según las actividades que desarrolle a lo largo del día, en condiciones de salud (Tabla P32-5) o enfermedad (Tabla P32-7) y se multiplicará este factor por el GER. Finalmente, se determinará el factor de lesión o agresión, correspondiente a la enfermedad diagnosticada (Tabla P32-7) y se multiplicará este factor por el resultado de "GER × factor de AF" para determinar el GET.

BIBLIOGRAFÍA

- Butte NF (2005). Energy requirements of infants. *Public Health Nutrition* 8(7A):953-967.
- Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients). <http://books.nap.edu/catalog/10490.html> (último acceso, abril-2010).
- WHO (1985). Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. WHO Technical Report Series No 724. Geneva.
- FAO (2001). Human Energy requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Food and Nutrition Technical Report Series No 1. Rome.
- Souba WW, Wilmore DW (1999). Diet and nutrition in the case of the patient with surgery, trauma, and sepsis. En "Modern nutrition in health and disease", pp. 1589-1618, M. E. Shils, J. A. Olson, M. Shike, A. C. Ross (eds.), Williams & Wilkins (9.^a ed.), Baltimore.

**PRESENTACIÓN DE RESULTADOS**

	Met I kcal/día	Met II kcal/día	Met III kcal/día	Met IV kcal/día	Met V kcal/día
Varón					
Edad 1					
Edad 2					
Mujer					
Edad 1					
Edad 2					

**COMENTARIOS**

Large empty area for providing comments or observations.

Encuestas dietéticas de valoración de la ingesta individual

E. Sánchez Campayo e I. Zazpe García

INTRODUCCIÓN

La anamnesis dietética es uno de los pilares en los que se basa la valoración del estado nutricional de un individuo. Los especialistas en nutrición y otros profesionales sanitarios necesitan información sobre el patrón de consumo alimentario y la ingesta de nutrientes para establecer la relación entre la dieta y el estado de salud de los individuos. La obtención de dicha información precisa del empleo de encuestas dietéticas o alimentarias. En esta práctica se van a explicar únicamente las más empleadas para valorar la ingesta individual: el recuerdo de 24 horas, el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA), la historia dietética y el diario dietético. Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas, limitaciones y aplicaciones (Tabla P33-1) que deben conocerse antes de su empleo en la práctica dietética.

Recuerdo de 24 hora: es uno de los métodos más usados para valorar la dieta actual, conocer con detalle los alimentos y bebidas ingeridos en las últimas 24 horas y calcular y valorar el contenido en nutrientes. A veces, la estimación de la ingesta se puede ampliar a las últimas 48 o 72 horas para reducir el sesgo de variabilidad en la ingesta intrasujeto. Para cumplimentar esta encuesta hay que anotar el alimento y la cantidad consumida, la forma de preparación, el tipo de alimento (por ejemplo, hay que diferenciar entre leche entera, desnatada o semidesnatada), los ingredientes de un plato, la marca comercial (si se conoce) y, por último, el lugar y la hora de consumo. Además, para realizar una estimación más precisa de la cantidad consumida, se pueden emplear apoyos visuales (fotos, réplicas de alimentos...).

Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA): es la encuesta más empleada actualmente en epidemiología nutricional. Consta de una lista más o menos extensa de alimentos y de una relación de frecuencias de consumo (diaria, semanal, mensual y anual). Por lo general, el CFCA hace referencia al consumo en el último año, para facilitar el recuerdo y evitar al mismo tiempo la variabilidad estacional, ya que el consumo de ciertos alimentos varía según la estación. Un CFCA es cualitativo si sólo informa de la frecuencia de dicho consumo y semicuantitativo, si además señala el tamaño de la ración típica (gramos o medidas caseras). Por último, señalar que es posible realizar la derivación de los nutrientes a partir de la frecuencia de consumo por grupos de una manera fácil y cómoda.

Historia dietética: es el método de recogida de información dietética actual y pasada más preciso y válido de todos. Consiste en una entrevista personal que incluye un recuerdo de 24 h, una lista pormenorizada de alimentos para que el encuestado señale la frecuencia con que los consume y un diario prospectivo de lo que se consume en tres días.

Diario dietético: método prospectivo muy preciso que evalúa la ingesta actual. Consiste en solicitar al encuestado que rellene a diario en un formulario durante 3, 7 o incluso más días, todo lo que come y bebe en el hogar o fuera de él. Este método requiere que el entrevistado sea instruido previamente sobre la manera de detallar las porciones consumidas.

OBJETIVO

Los objetivos de esta sesión práctica son en primer lugar conocer los aspectos más relevantes

Tabla P33-1. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LAS ENCUESTAS DIETÉTICAS MÁS EMPLEADAS EN LA PRÁCTICA

	Ventajas	Inconvenientes
Recordatorio 24 h	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido y económico - Buen grado de aceptación y comprensión - Indica la ingesta habitual (seriada) - Basta con un solo contacto 	<ul style="list-style-type: none"> - No es muy útil para estudios analíticos - La memoria del paciente puede determinar la eficacia del cuestionario - La estimación del tamaño de las porciones puede ser inexacto - Necesidad de entrevistadores cualificados
Cuestionario de frecuencia	<ul style="list-style-type: none"> - Económico - Posibilidad de enviarlo por correo - Estima ingesta habitual - Permite establecer asociaciones entre dieta-enfermedad - No precisa entrevistadores preparados - Existe una validación en España 	<ul style="list-style-type: none"> - Depende de la memoria del paciente - Precisión relativa - Es difícil su validación - Poco eficaz en niños y ancianos - Posible limitación a la hora de seleccionar los alimentos del cuestionario
Historia dietética	<ul style="list-style-type: none"> - Posibilidad de empleo con analfabetos - Es concreto y completo - Incluye datos sobre el cocinado - Más preciso que el CFCA 	<ul style="list-style-type: none"> - Precisa de gran cooperación y de personal cualificado - Precio elevado - No hay un modelo patrón para interpretar la información

de las encuestas dietéticas más empleadas en la práctica, y en segundo lugar, iniciarse en su manejo con el fin de comprobar lo complicado que resulta la recogida de datos con precisión.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

La determinación de la ingesta de nutrientes se basa en la recogida de información respecto a los alimentos consumidos y su transformación en nutrientes utilizando las tablas de composición apropiadas.

Material

- Recuerdo de 24 horas.
- Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.
- Cuestionario de preferencias y aversiones alimentarias.

Protocolo

1. Por parejas, se van rellenando mediante entrevista personal cada una de las encuestas dietéticas recogidas en esta práctica, anotando al mismo tiempo los problemas o dudas que van surgiendo en la recogida de los datos.
2. A continuación, se exponen las dificultades encontradas y, por último, se proponen soluciones o pautas de actuación que permitan recoger datos sobre variables dietéticas con la mayor precisión posible.

BIBLIOGRAFÍA

- Bes M, Sánchez-Villegas A, Martínez-González MA (2007). Epidemiología nutricional. Alimentación y salud. En "Compendio de Salud Pública", pp. 504-507. Ulzama digital, Pamplona.
- Madrigal H, Martínez H, Marques I (2002). Valoración de la ingesta dietética. En "Alimentación y salud pública", pp. 41-49. (2.ª ed.). McGraw-Hill, Madrid.

Serra Majem Ll, Ribas Barba L y Aranceta Bartrina J (2006). Nutrición y Salud Pública (2.ª ed.). Evaluación del consumo de alimentos en poblaciones. Encuestas Alimentarias, en "Nutrición y salud pública.

Métodos, bases científicas y aplicaciones", pp. 139-140. Elsevier, Barcelona.

Willett W (2001). Teaching epidemiology (2.ª ed). Oxford University Press, Nueva York.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

La presentación de resultados consiste en cumplimentar los siguientes cuestionarios de hábitos alimentarios y estilos de vida, de frecuencia de consumo de alimentos y de preferencias y aversiones.

ANAMNESIS DIETÉTICA. ENCUESTAS ALIMENTARIAS

DATOS PERSONALES

Nombre y apellidos Fecha

Edad Sexo Estado civil N.º de hijos:

Lugar de nacimiento Residencia

Motivo de la consulta

Ocupación:

Talla cm Peso actual kg Peso habitual kg

CUESTIONARIO DE HÁBITOS ALIMENTARIOS Y ESTILOS DE VIDA*

Habitualmente, ¿cuáles de estas comidas realiza?

Desayuno	<input type="checkbox"/>	Merienda	<input type="checkbox"/>
Media mañana	<input type="checkbox"/>	Cena	<input type="checkbox"/>
Comida	<input type="checkbox"/>	Recena	<input type="checkbox"/>

Otros:

¿Cuántos días a la semana va a comer a casa al mediodía?.....

¿Mantiene un peso estable a lo largo del tiempo?

¿Ha intentado reducir peso alguna vez?..... ¿Por qué?

¿Toma algún preparado vitamínico o mineral?.....

¿Le preocupa su alimentación?.....

¿Practica algún tipo de actividad física?.....

Habitualmente, ¿cuánto tiempo anda al día?.....

¿Cuántas horas duerme al día?.....

¿Cuántas horas trabaja/estudia al día?.....

¿Tiene alguna enfermedad?..... ¿Cuál?.....

¿Fuma?..... ¿Cuántos cigarrillos al día?.....

¿Suele beber alcohol?..... Tipo de bebida y cantidad diaria o semanal

En comidas y cenas, ¿qué suele beber?

¿Toma pan en las comidas? ¿de qué tipo?..... ¿Cuántas rebanadas?

¿Qué aceite utiliza para aliñar?..... ¿Y para cocinar?.....

*Se puede consultar otro modelo de historia dietética en: Muñoz M, Aranceta J, Gacía-Jalón I (2004). Nutrición aplicada y Dietoterapia, pp. 1293-1297 (2.ª ed.). Eunsa, Pamplona.

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS *(continuación)*

Por cada alimento, marque el recuadro que indica la frecuencia de consumo por término medio durante el año pasado	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO								
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA			
		1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	+6
BEBIDAS									
Bebidas carbonatadas con azúcar (un vaso)									
Bebidas carbonatadas light (un vaso)									
Zumos industriales (un vaso)									
Café descafeinado (una taza, 50 cc)									
Café (una taza, 50 cc)									
Té (una taza, 50 cc)									
Vino (un vasito, 100 cc)									
Cerveza (una jarra, 330 cc)									
Licores (una copa, 50 cc)									

*Tomado del ESTUDIO PREDIMED. Nodo Pamplona (AP-UNAV), Departamento de Epidemiología y Salud Pública, Universidad de Navarra.

CUESTIONARIO DE PREFERENCIAS Y AVERSIONES ALIMENTARIAS

Indique por orden de preferencia para cada grupo, los tres alimentos que más le gusten. Si hay algún alimento de ese grupo que no consuma, señálelo también.

Alimentos	1	2	3	Alimentos que no consuma
Carnes				
Embutidos				
Pescados				
Huevos				
Lácteos				
Cereales				
Frutas y frutos secos				
Verduras y hortalizas				
Legumbres				
Repostería				
Bebidas no alcohólicas				
Bebidas alcohólicas				
Aperitivos				

En general, señale los tres alimentos que más le gusten:

- 1.
- 2.
- 3.

En general, señale los tres alimentos que menos le gusten:

- 1.
- 2.
- 3.

COMENTARIOS



Cuestionarios de valoración rápida del estado nutricional.

Mini Nutritional Assessment (MNA)

M. Cuervo Zapatel y J. A. Martínez Hernández

INTRODUCCIÓN

La valoración nutricional, en general, consiste en la determinación del nivel de salud y bienestar de un individuo o población desde el punto de vista de la alimentación, y depende del grado en el que las necesidades de nutrientes (fisiológicas, bioquímicas y metabólicas) quedan cubiertas por la ingesta de alimentos en la dieta. Este equilibrio entre demanda y requerimientos resulta afectado por muchos factores como edad, sexo, nivel de actividad o situación fisiopatológica, entre otros. En este contexto, la realización de una evaluación nutricional completa requiere de muchos recursos, tanto materiales como humanos, y no siempre se dispone de ellos, incluyendo el tiempo para realizar las determinaciones. Por ello cuando no es posible realizar una valoración detallada del estado nutricional de todas y cada una de las personas de uno o varios grupos de población, resulta más adecuado realizar un primer cribado, para identificar aquellos individuos en riesgo nutricional, y realizar después una evaluación más detallada, a las personas que realmente presentan una situación nutricional comprometida. Para realizar este cribado, se han desarrollado en las últimas décadas distintas escalas de valoración rápida del estado nutricional para permitir una intervención nutricional temprana cuando sea necesaria. En general, son cuestionarios rápidos, sencillos y que no requieren personal especialmente cualificado para realizarlo, ni determinaciones analíticas, lo que facilita su aplicación.

De entre todos los cuestionarios existentes, se presenta en esta práctica el *Mini Nutritional Assessment* (MNA), como ejemplo aplicado de uno de ellos.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es realizar un cribado poblacional, con objeto de detectar de manera rápida aquellos individuos en riesgo nutricional, y centrar los recursos disponibles en aquellas personas que realmente lo necesitan.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

El MNA es un cuestionario desarrollado para conocer el riesgo de desnutrición en personas mayores y se ha seleccionado, entre otros, por su mayor sensibilidad (capacidad de un test para detectar correctamente a los sujetos con enfermedad) y especificidad (capacidad de un test para detectar correctamente a los sujetos sin enfermedad), su amplia utilización a nivel mundial (traducido a más de 20 idiomas) y porque se ha validado para utilizar en cualquier entorno en el que viva la persona mayor: hospital, residencia o domicilio particular.

A partir de la versión completa del MNA, desarrollada en 1991 y validada en 1993 en dos contextos sociales diferentes: Albuquerque (Nuevo Méjico-EEUU) y Toulouse (Francia), se desarrolló en 2001 una versión reducida, que identificó 6 preguntas de las 18 que forman el MNA completo, las cuales se correlacionaron estrechamente con la versión completa del cuestionario. De esta manera, actualmente existe la posibilidad de realizarlo en dos etapas: una primera versión reducida y otra más detallada para aquellos casos que presentan en la primera la posibilidad de tener desnutrición.

Tabla P34-1. CUESTIONARIO MINI NUTRITIONAL ASSESSMENT (MNA)



Mini Nutritional Assessment MNA®

Apellidos:		Nombre:		
Sexo:	Edad:	Peso, kg:	Talla, cm	Fecha:

Responda a la primera parte del cuestionario indicando la puntuación adecuada para cada pregunta. Sume los puntos correspondientes al cribaje y si la suma es igual o inferior a 11, complete el cuestionario para obtener una apreciación precisa del estado nutricional.

Cribaje

A. Ha perdido el apetito: Ha comido menos por falta de apetito, problemas digestivos, dificultades de masticación o deglución en los últimos 3 meses:
0 = ha comido mucho menos
1 = ha comido menos
2 = ha comido igual

B. Pérdida reciente de peso (< 3 meses)
0 = pérdida de peso > 3 kg
1 = no lo sabe
2 = pérdida de peso entre 1 y 3 kg
3 = no ha habido pérdida de peso

C. Movilidad
0 = de la cama al sillón
1 = autonomía en el interior
2 = sale del domicilio

D. Ha tenido una enfermedad aguda o situación de estrés psicológico en los últimos 3 meses:
0 = sí 2 = no

E. Problemas neuropsicológicos
0 = demencia o depresión grave
1 = demanda moderada
2 = sin problemas psicológicos

F. Índice de masa corporal (IMC = peso (talla)² en kg/m²)
0 = IMC > 19
1 = 19 ≥ IMC < 21
2 = 21 ≥ IMC < 23
3 = IMC ≥ 23

Evaluación del cribaje (subtotal máx. 14 puntos)

12 puntos o más normal - no es necesario continuar la evaluación

11 puntos o menos: posible malnutrición - continuar la evaluación

G. ¿El paciente vive independiente en su domicilio?
1 = sí 0 = no

H. ¿Toma más de 3 medicamentos al día?
0 = sí 1 = no

I. ¿Úlceras o lesiones cutáneas?
0 = sí 1 = no

J. ¿Cuántas comidas completas toma al día?

0 = 1 comida
1 = 2 comidas
2 = 3 comidas

K. Consume el paciente

- productos lácteos al menos una vez al día? sí no
- huevos o legumbres 1 ó 2 veces a la semana? sí no
- carne, pescado o aves, diariamente: sí no

0,0 = 0 ó 1 sies

0,5 = 2 sies

1,0 = 3 sies

L. ¿Consume frutas o verduras al menos 2 veces al día?

0 = no 1 = sí

M. ¿Cuántos vasos de agua u otros líquidos toma al día? (agua, zumo, café, te, leche, vino, cerveza...)

0,0 = menos de 3 vasos
0,5 = de 3 a 5 vasos

1,0 = más de 5 vasos

N. ¿Forma de alimentarse?

0 = necesita ayuda
1 = se alimenta solo con dificultad.

2 = se alimenta solo sin dificultad.

O. ¿Se considera el paciente que está bien nutrido?

0 = malnutrición grave
1 = no lo sabe o malnutrición moderada

2 = sin problemas de nutrición

P. En comparación con las personas de su edad, ¿cómo encuentra el paciente su estado de salud?

0,0 = peor
0,5 = no lo sabe
1,0 = igual

2,0 = mejor

Q. Circunferencia braquial (CB en cm)

0,0 = CB < 21
0,5 = 21 ≤ CB ≤ 22

1,0 = CB > 22

R. Circunferencia de la pantorrilla (CP en cm)

0 = CP < 31
1 = CP ≥ 31

Evaluación (máx. 16 puntos)

Cribaje

Evaluación global (máx. 30 puntos)

Evaluación del estado nutricional

De 17 a 23,5 puntos riesgo de malnutrición

Menos de 17 puntos malnutrición

Ref Vellas B, Vilars H, Abellán G, et al. Overview of the MNA® - its History and Challenges. *J Nutr Health Aging* 2006; 10: 456-465.
Rubenstein LZ, Harker JO, Salvio A, Guigoz Y, Vellas B. Screening for Undernutrition in Geriatric Practice. Developing the Short-form Mini Nutritional Assessment (MNA-SF). *J Geront* 2001; 56A: M366-377.
Guigoz Y. The Mini-Nutritional Assessment (MNA®) Review of the Literature - What does it tell us? *J Nutr Health Aging* 2006; 10: 466-487.
©Société des Produits Nestlé, S.A., Vevey, Switzerland, Trademarks Owners ©Nestlé, 1994. Revisión 2006. N67200 12/99 10M
Para más información: www.mna-elderly.com

Material

- Cuestionario MNA.
- Peso de precisión.
- Tallímetro.
- Cinta métrica inelástica.

Protocolo

El cuestionario MNA consta de 18 preguntas (Tabla P34-1). Cada pregunta ofrece diferentes respuestas posibles, cada una de ellas asociada a una valoración numérica determinada. La suma total de los puntos correspondientes a cada respuesta permite la valoración global de la situación de desnutrición, de la persona mayor en este caso.

Las variables estudiadas en la versión completa del MNA se agrupan en cuatro apartados:

1. Parámetros e índices antropométricos: índice de masa corporal, pérdida de peso y perímetros braquial y de la pantorrilla.
2. Evaluación global: hace referencia al estilo de vida, movilidad y medicación.

3. Parámetros dietéticos: preguntas sobre el tipo de dieta y líquidos ingeridos, número de comidas y autonomía en la alimentación.
4. Valoración subjetiva: percepción personal de la persona encuestada sobre nutrición y salud.

Como se ha expuesto anteriormente, existe la posibilidad de realizarlo en dos etapas: una primera versión reducida y otra más detallada para aquellos casos que presentan en la primera la posibilidad de tener desnutrición (Tabla P34-1).

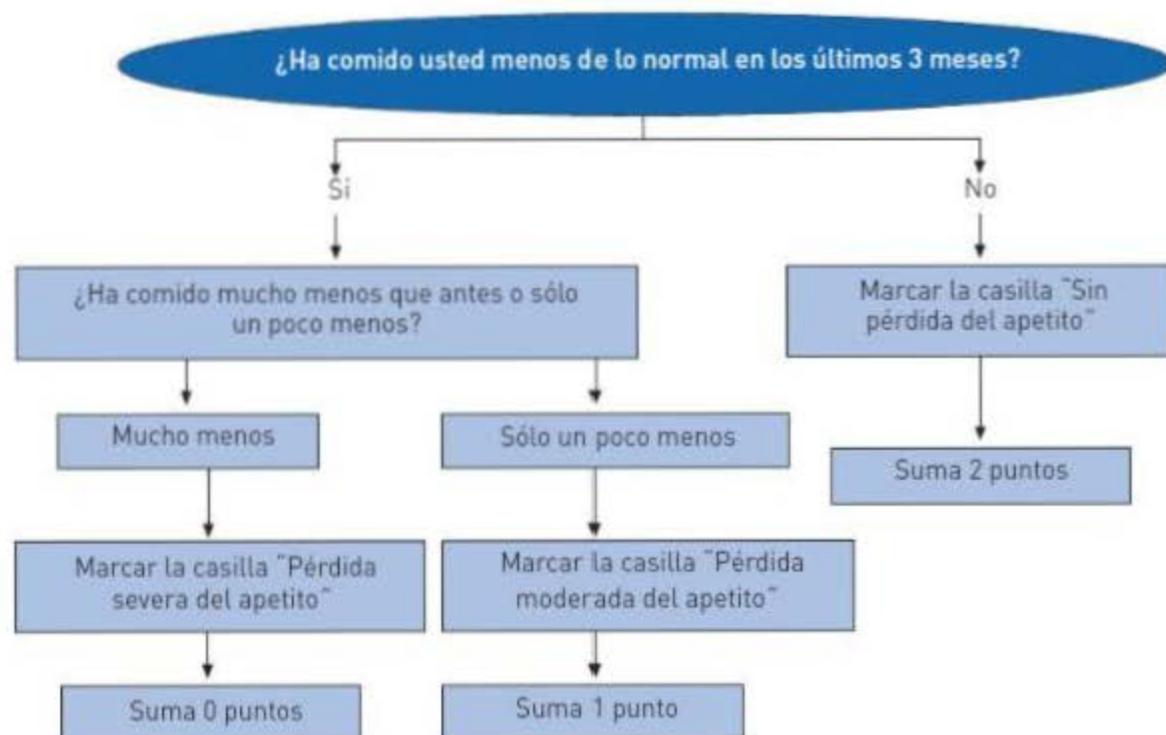
Cálculos

Una vez completadas las 6 preguntas de la primera parte del cuestionario, también llamado "sección de cribado", hay que sumar la puntuación total obtenida en función de las opciones marcadas. Si el resultado es:

- 12, 13 o 14, se considera que el encuestado no está en riesgo de sufrir desnutrición y no se considera necesario completar el resto del cuestionario.

Primera parte del cuestionario MNA: versión reducida

Pregunta n.º 1: "¿Ha perdido el apetito? ¿Ha comido menos por falta de apetito, problemas digestivos, dificultades de masticación o alimentación en los últimos tres meses?"



- 11 o menos, el encuestado puede estar en riesgo de sufrir desnutrición, por lo que debe completarse necesariamente el resto del cuestionario (las 12 preguntas de la 2.ª parte).

Una vez completadas las 18 preguntas, se suma la puntuación obtenida, sobre un máximo de 30 puntos, para realizar la evaluación global. Si el resultado es:

- > 23,5, el encuestado NO está en riesgo ni en estado de desnutrición.
- Entre 17 y 23,5 puntos (ambos incluidos), el encuestado presenta riesgo de desnutrición, por lo que conviene realizar una exploración más completa y aconsejar al encuestado realizar un seguimiento dietético.
- < 17 puntos, el encuestado se encuentra en situación de desnutrición, por lo que conviene tanto realizar una exploración más detallada como derivar al sujeto al médico.

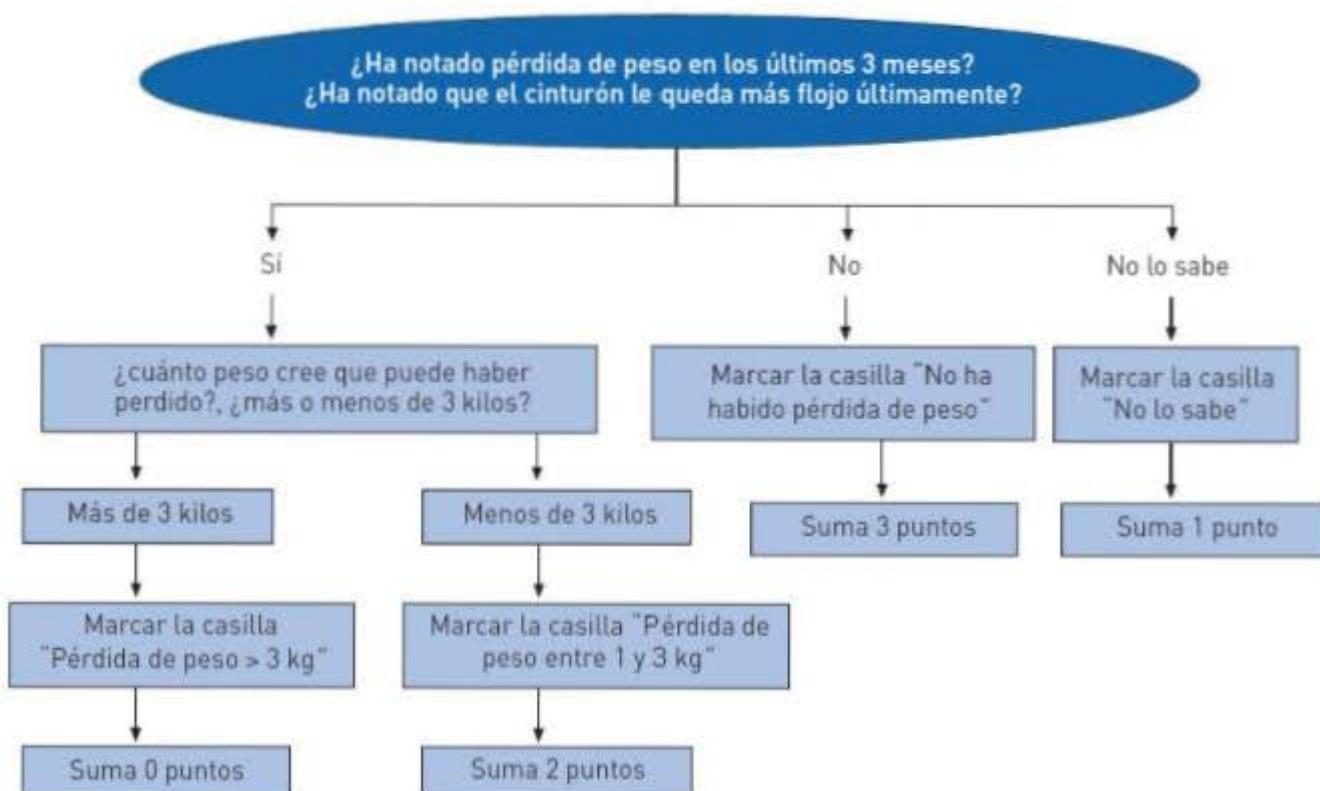
Con objeto de recoger unos resultados representativos y comparables entre todos los participantes, conviene preparar protocolos de interpretación de cada una de las preguntas que integran el cuestionario. En este sentido, se pre-

sentan a continuación los algoritmos de decisión que pretenden ayudar en la interpretación uniforme de cada una de las preguntas.

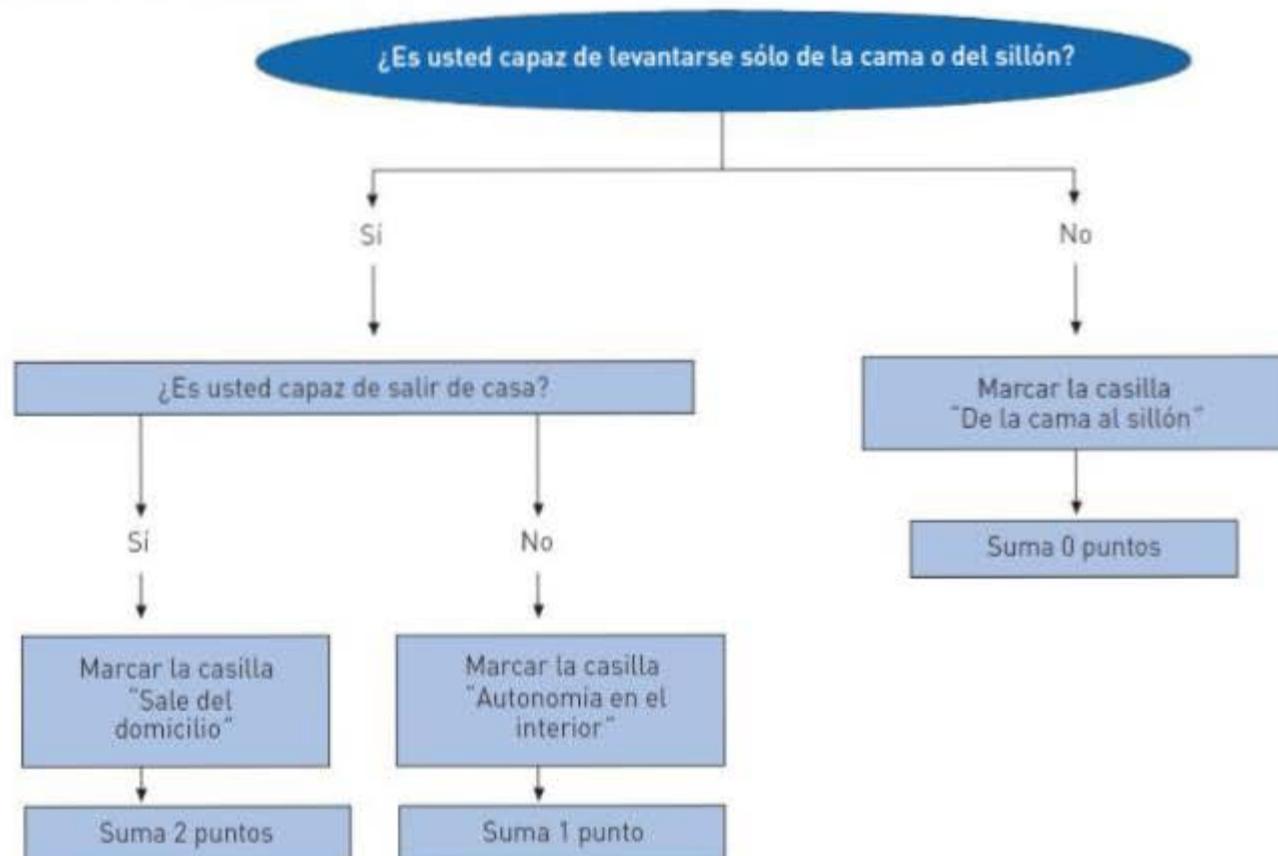
BIBLIOGRAFÍA

- Cuervo M, García A, Ansorena D, Sánchez-Villegas A, Martínez-González M, Astiasarán I, Martínez JA (2009). Nutritional assessment interpretation on 22 007 Spanish community-dwelling elders through the Mini Nutritional Assessment test. *Public Health Nutr* 12(1):82-90.
- Guigoz Y, Vellas B, Garry PJ (1994). Mini Nutritional Assessment: a practical assessment tool for grading the nutritional state of elderly patients. *Facts Res Gerontology* 2:15-59.
- Rubenstein LZ, Harker J, Guigoz Y, Vellas B (1999). Comprehensive geriatric assessment (CGA) and the MNA: an overview of CGA, nutritional assessment, and development of a shortened version of the MNA. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme* 1:101-15; discussion 15-6.
- Vellas B, Villars H, Abellan G, Soto ME, Rolland Y, Guigoz Y, Morley JE, Chumlea W, Salva A, Rubenstein LZ, Garry P (2006). Overview of the MNA(R) - Its History and Challenges. *J Nutr Health Aging* 10(6):456-65.

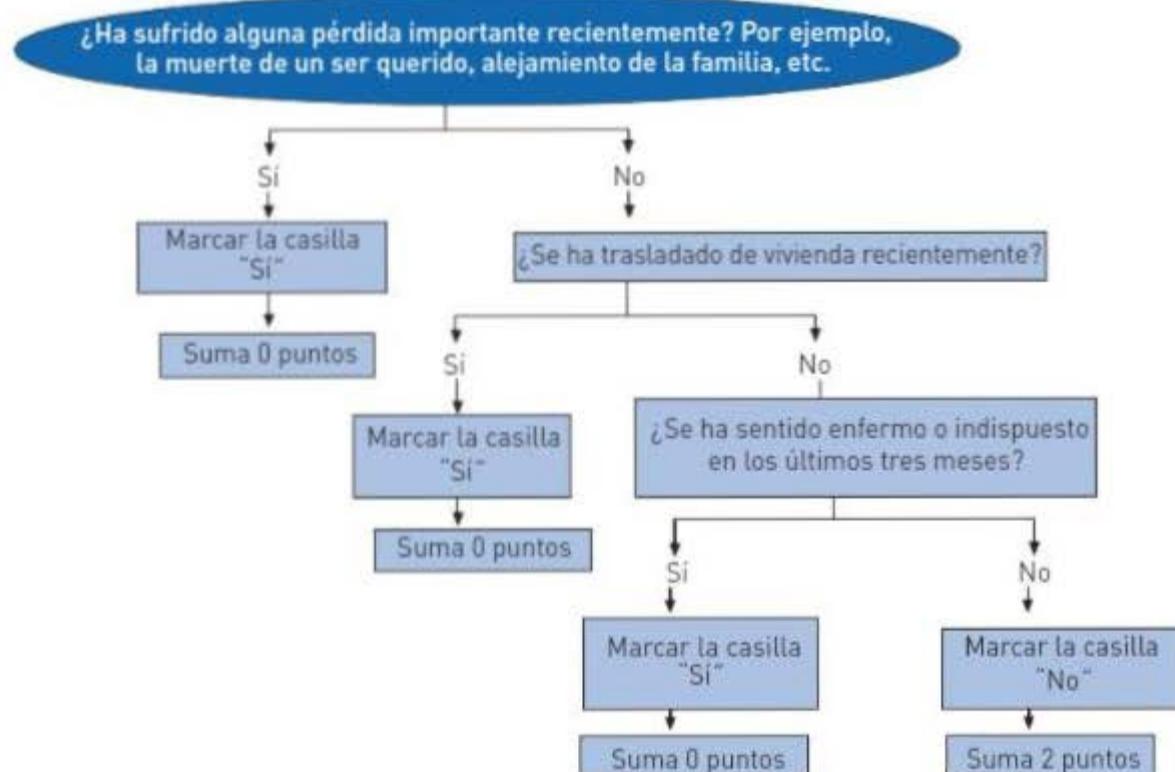
Pregunta n.º 2: "Pérdida reciente de peso (< 3 meses)"



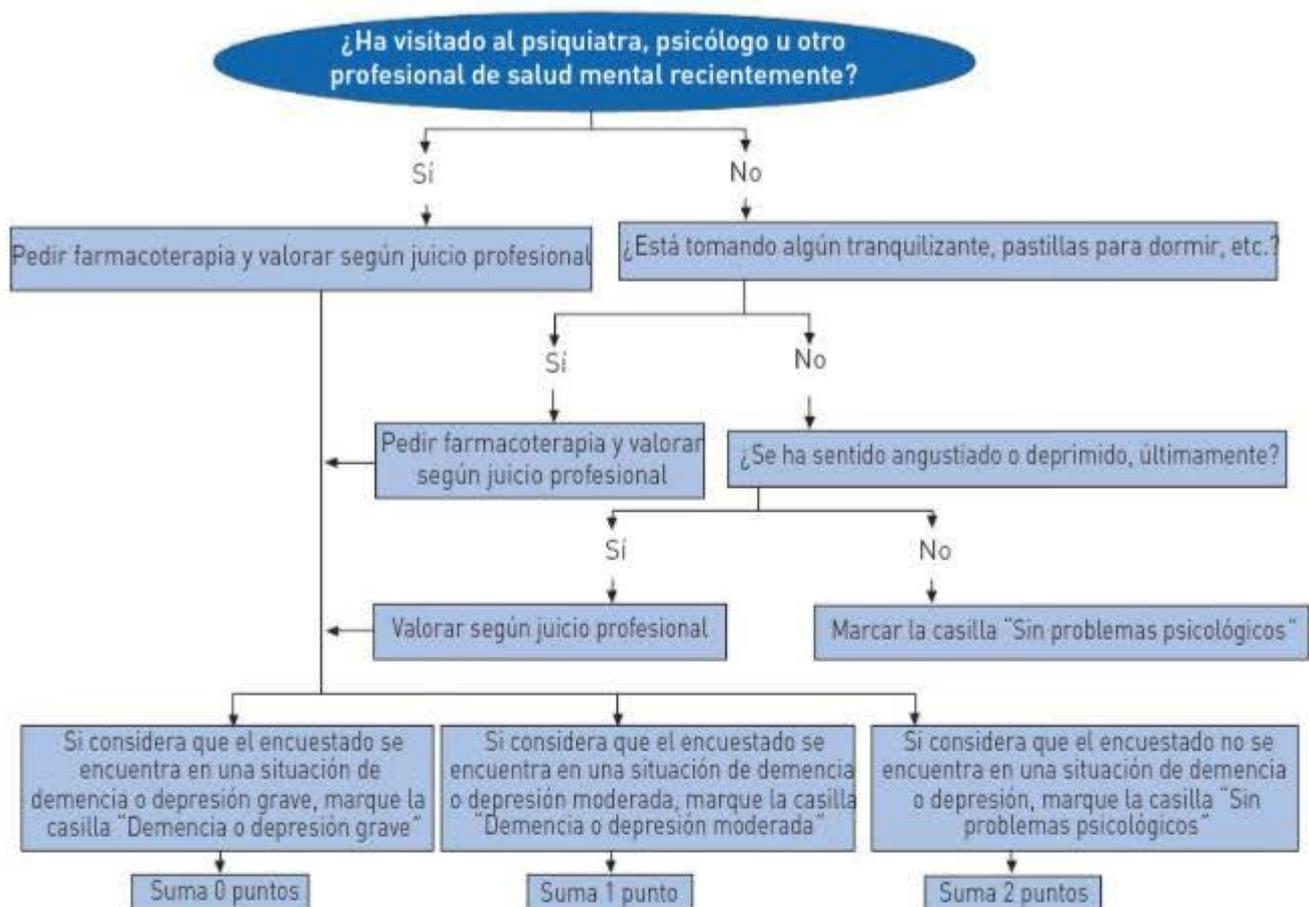
Pregunta n.º 3: "Movilidad"



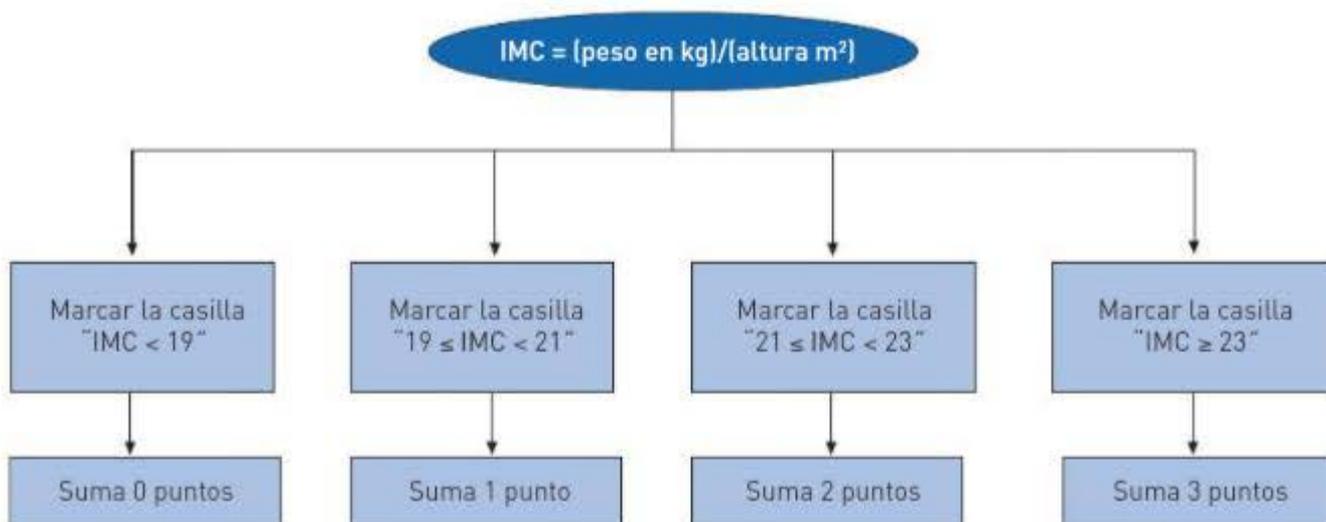
Pregunta n.º 4: "¿Ha tenido alguna enfermedad importante o situación de estrés psicológico en los últimos 3 meses?"



Pregunta n.º 5: "Problemas neuropsicológicos"

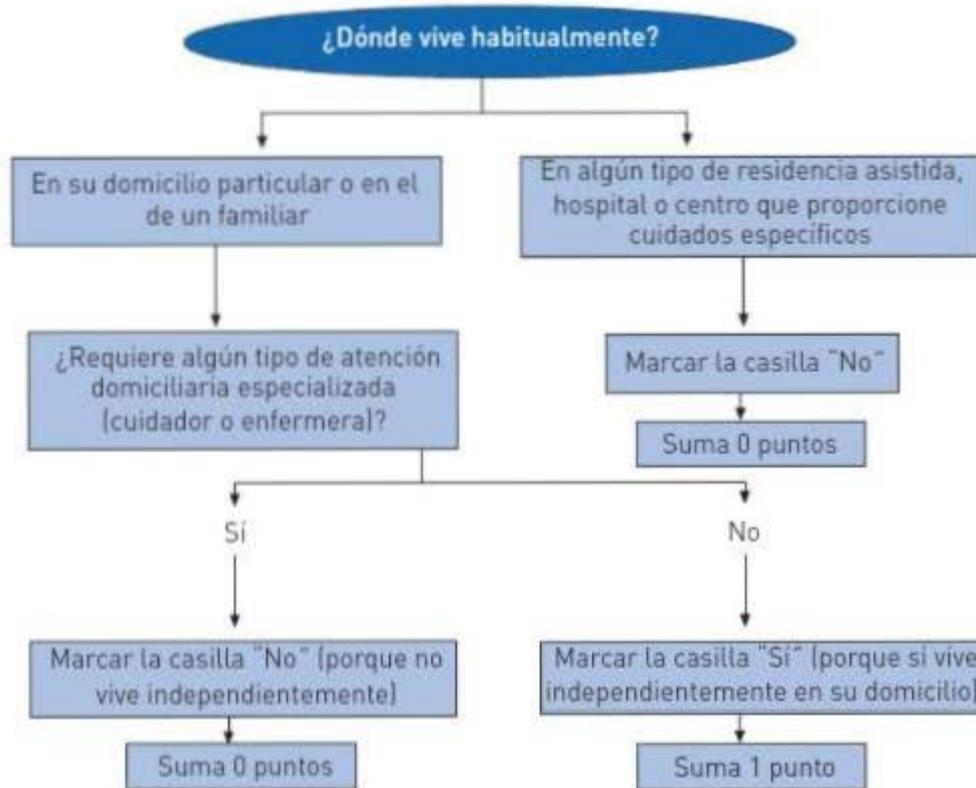


Pregunta n.º 6: "Índice de Masa Corporal (IMC = (peso en kg)/altura m²)"

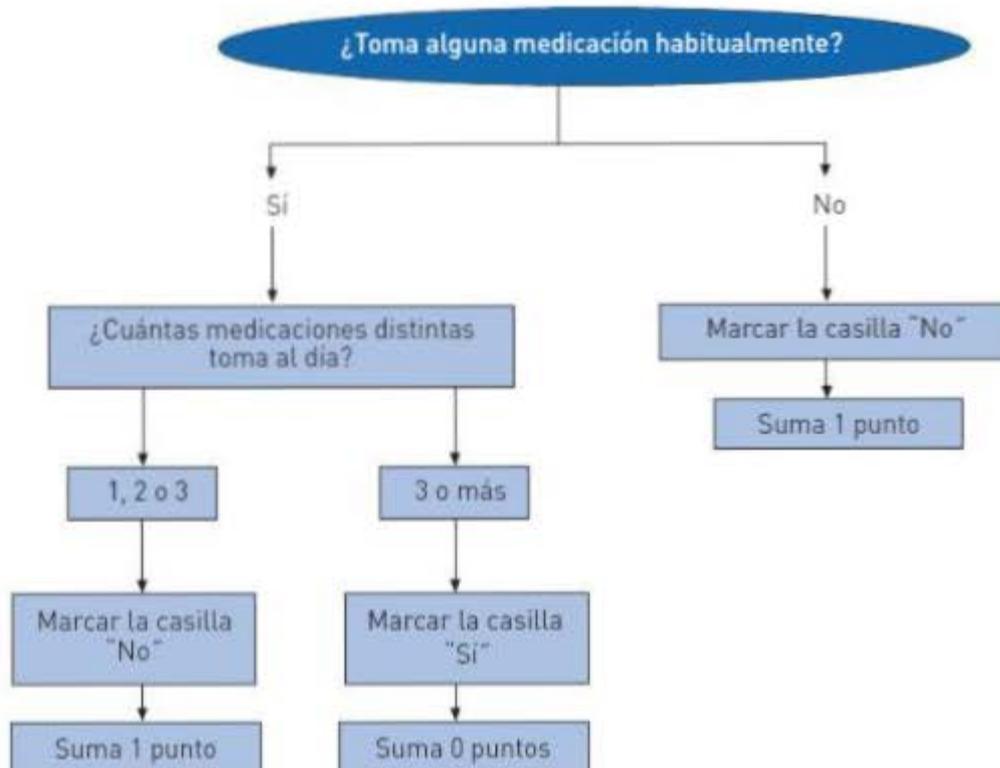


Segunda parte del cuestionario MNA: versión completa

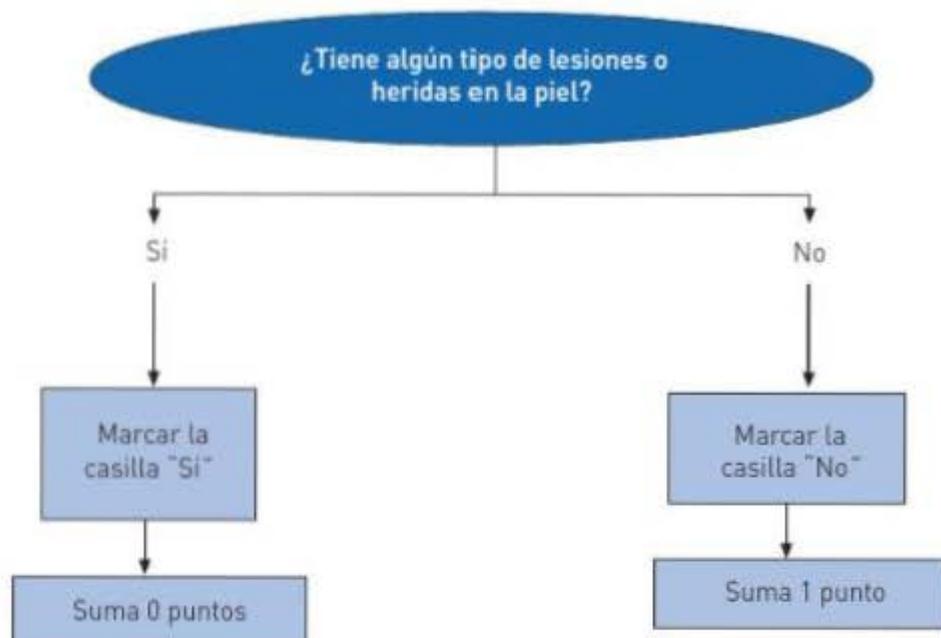
Pregunta n.º 7: "¿El paciente vive independientemente en su domicilio?"



Pregunta n.º 8: "¿Toma más de tres medicamentos al día?"



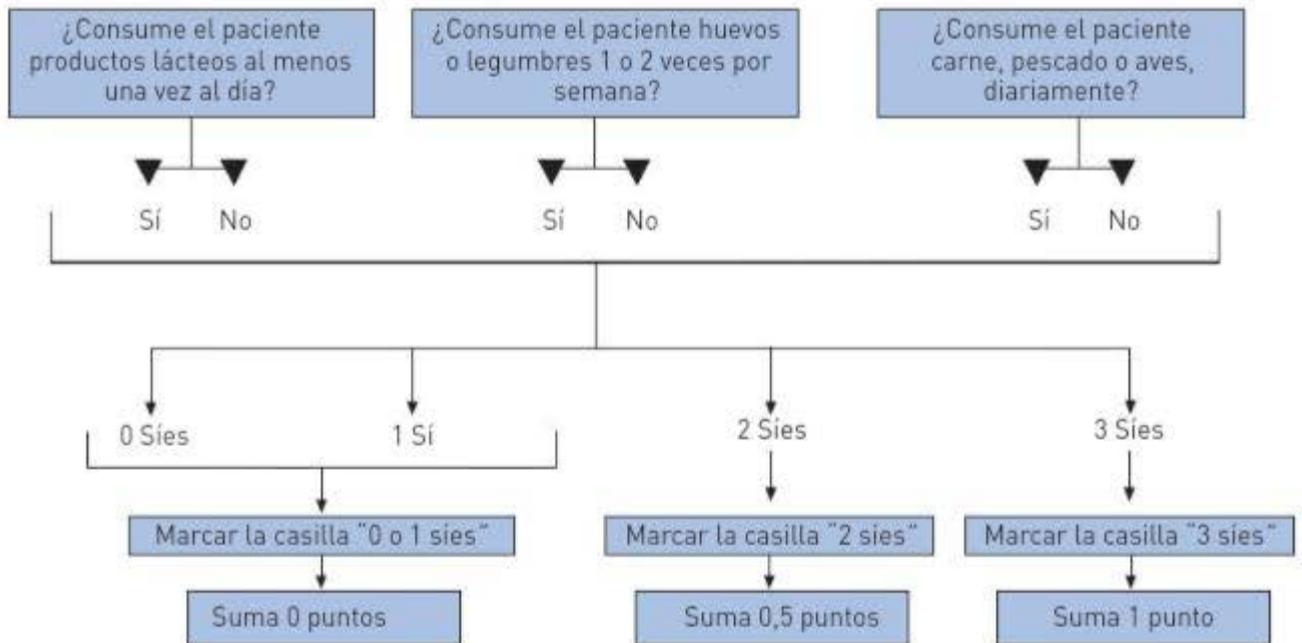
Pregunta n.º 9: "¿Úlceras o lesiones cutáneas?"



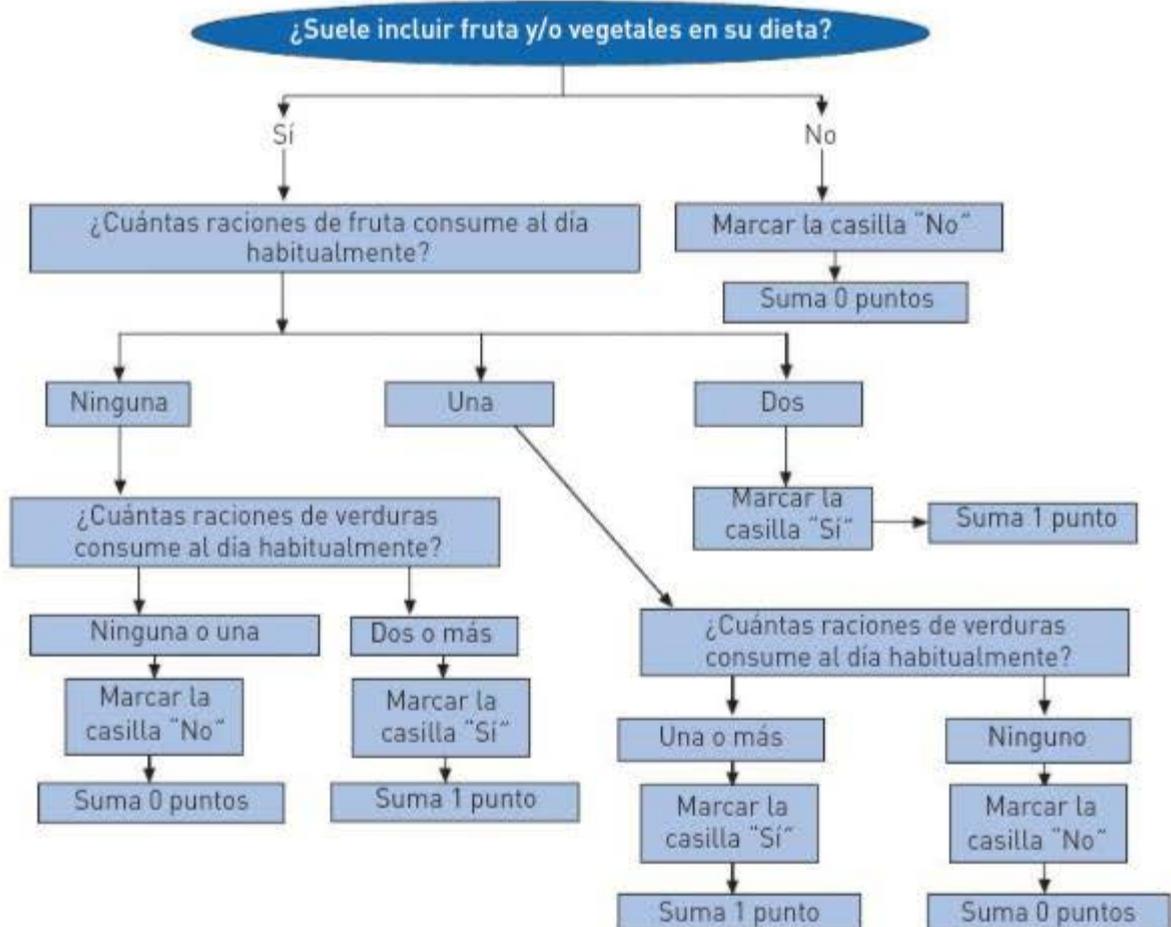
Pregunta n.º 10: "¿Cuántas comidas completas realiza al día?"



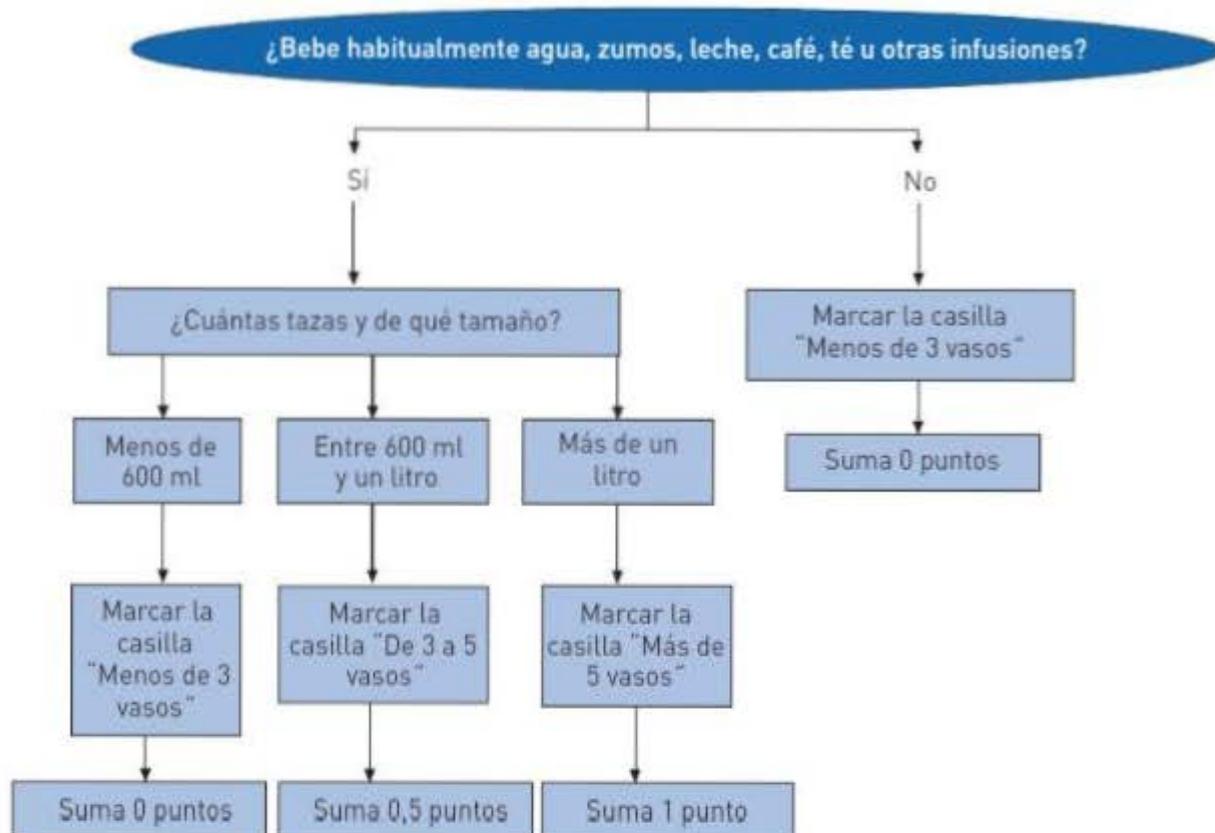
Pregunta n.º 11: "¿Consume el paciente productos lácteos al menos una vez al día?" "¿Consume el paciente huevos o legumbre 1 o 2 veces por semana?" "¿Consume el paciente carne, pescado o aves, diariamente?"



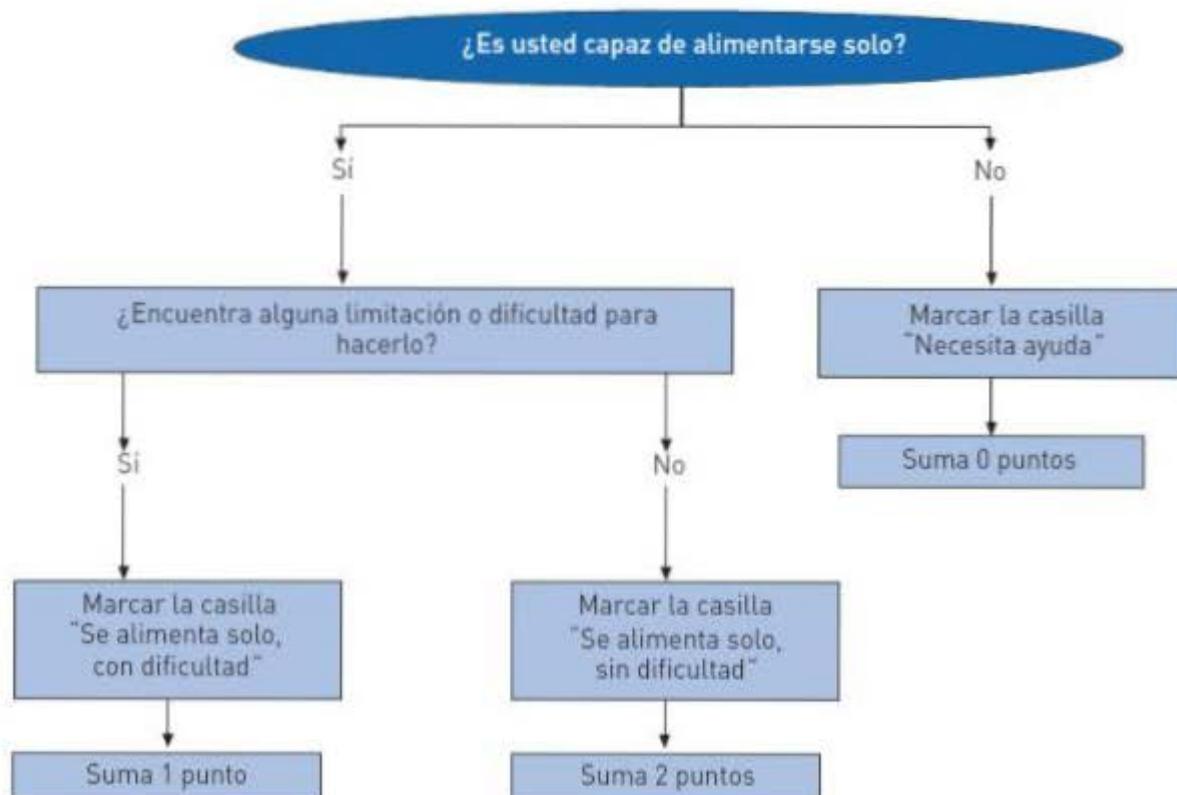
Pregunta n.º 12: "¿Consume frutas o verduras al menos dos veces al día?"



Pregunta n.º 13: "¿Cuántos vasos de agua u otros líquidos toma al día?"



Pregunta n.º 14: "Forma de alimentarse"



Pregunta n.º 15: "¿Se considera el paciente que está bien nutrido?"

¿Usted considera que come bien?
¿Cómo de bien nutrido se considera usted que está?

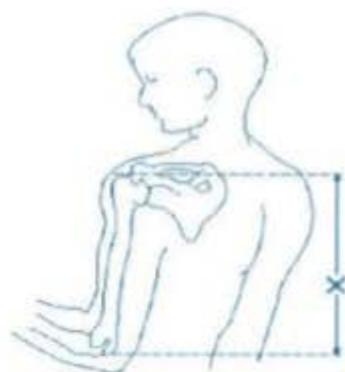


Pregunta n.º 16: "¿Cómo encuentra el paciente su estado de salud en comparación con las personas de su misma edad?"

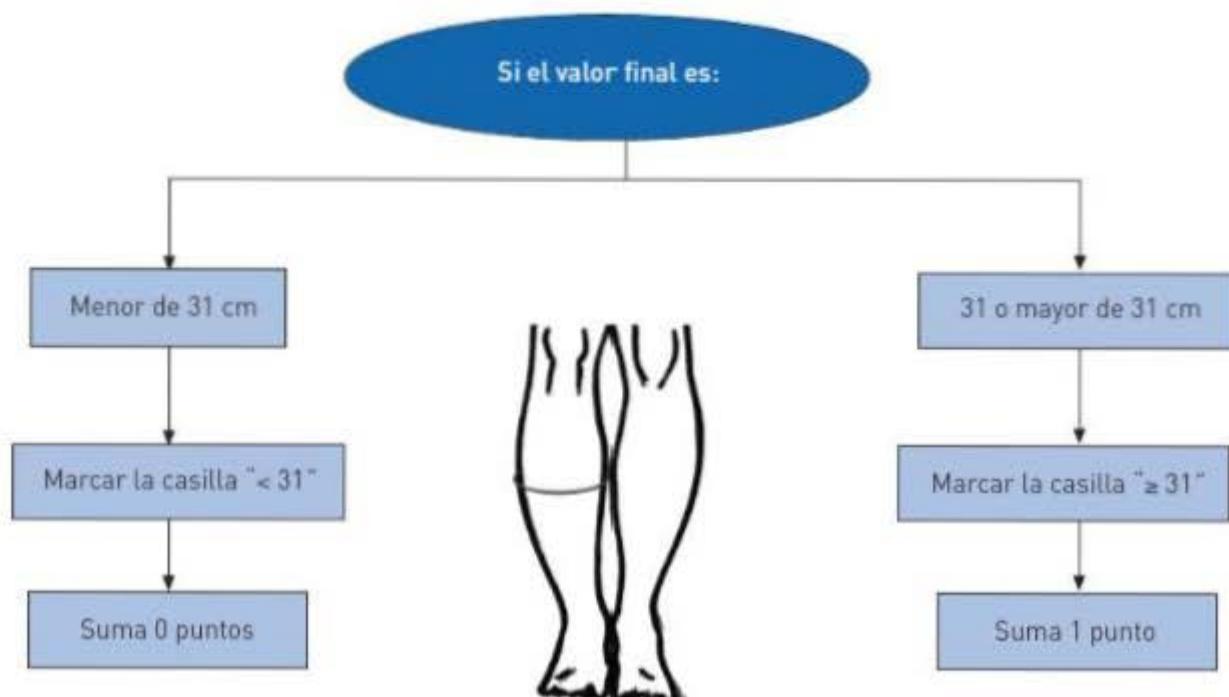
¿Cómo considera usted que es su estado de salud?



Pregunta n.º 17: "Circunferencia braqual (CB en centímetros)"



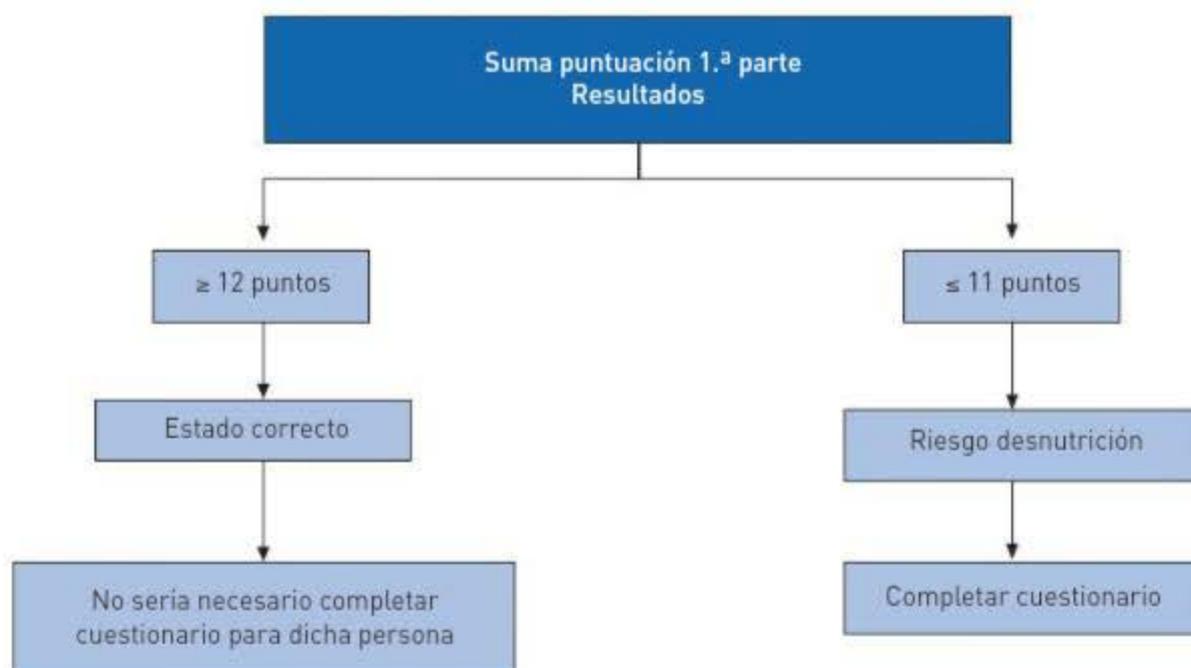
Pregunta n.º 18: "Circunferencia de la pantorrilla (CP en centímetros)"



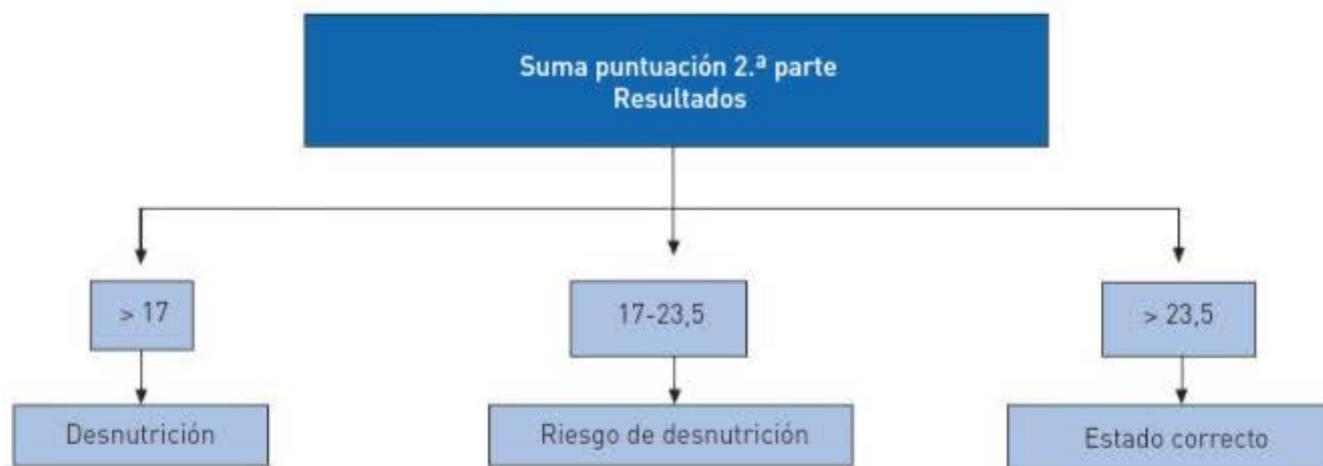


PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Evaluación del cribado (1.ª parte)



Evaluación global



COMENTARIOS

Empleo de listas de intercambio para enfermos renales

G. Peré Ceballos, M. Hernández Ruiz de Eguilaz

INTRODUCCIÓN

La función renal juega un papel muy importante dentro del organismo, participando en la regulación del equilibrio ácido-base, en el balance hidroelectrolítico, en el metabolismo fosfocálcico y en el balance nitrogenado, entre otras muchas funciones. Por ello, la insuficiencia renal aguda (IRA) o la insuficiencia renal crónica (IRC), afectan de manera especial a la situación metabólica nutricional de los pacientes.

La enfermedad renal crónica (ERC) se define como la disminución de la función renal, expresada por un filtrado glomerular (FG) < 60 mL/min/1,73 m², o como la presencia de daño renal de forma persistente.

Los requerimientos nutricionales que se ven más afectados en la enfermedad renal son:

Energía: la ingesta energética varía entre 35-45 kcal/kg/día. El gasto energético también se puede calcular a través de fórmulas convencionales como la de Harris-Benedict.

Proteínas: las recomendaciones proteicas varían entre 0,6-0,75 g/kg/día.

Minerales: los pacientes con ERC deben tener en cuenta: fósforo entre 600-1.000 mg/día. Potasio entre 1.500-2.000 mg/día. Sodio entre 1,8-2,5 g/día.

Dentro del plan de alimentación de enfermos renales, el empleo de listas de intercambio permite confeccionar la dieta de forma personal e individualizada según las apetencias y gustos del paciente, el cual va a seguir una dieta durante un largo período de tiempo.

Para crear las listas de intercambios, deben unificarse los alimentos, pertenecientes a un mismo

grupo o no, teniendo en cuenta que contengan la misma proporción o cantidad de un determinado nutriente o nutrientes. Para su correcta utilidad en el tratamiento dietético de cualquier enfermedad, deben unificarse los alimentos en función de los tres macronutrientes (hidratos de carbono, proteínas y grasas) y posteriormente unificar el contenido calórico, aplicando 4 kcal/g en el caso de hidratos y proteínas, y 9 kcal/g en el caso de las grasas.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es familiarizarse con el manejo de las listas de intercambio para crear menús, en este caso para enfermos renales, sin necesidad de tener que calibrarlos.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Atendiendo a las características de edad, peso, talla y situación fisiopatológica del paciente, se confecciona una dieta para un día, utilizando las listas de intercambio.

A partir de esta dieta, se pueden obtener distintos tipos de menús, en los cuales varían los alimentos que la componen, pero no los principios inmediatos.

Material

- Listas de intercambio “Sistema de intercambios para la confección de dietas y planificación de menús” (Rusolillo y Marques, 2008).

- Tablas de composición de alimentos (Mataix, 2009).

Protocolo

Esta práctica consiste en confeccionar una dieta para un paciente con IRC que no se encuentra en programa de diálisis, teniendo en cuenta que, en este tipo de pacientes, es de suma importancia controlar el aporte proteico, el fósforo, el

sodio y el potasio. Se facilita una tabla con los alimentos que por su alto contenido en fósforo y/o potasio se deben limitar (Tablas P35-1 y P35-2).

Las dietas deberán ser elaboradas mediante el sistema de intercambios y posteriormente se calibrarán con las tablas de composición de alimentos, para comprobar que se ajustan los principios inmediatos.

Alimentos con un alto contenido en potasio y fósforo

Tabla P35-1. ALIMENTOS A MODERAR POR SU ALTO CONTENIDO EN FÓSFORO (> 200-100 MG/100 G)

Grupo de alimento	Alimento
Cereales y derivados	Cereales para el desayuno, ricos en fibra, <i>muesli</i> para el desayuno, arroz, pasta y pan integral
Carnes y pescados y derivados	Sardina, rape, lubina, salmón, pollo, salchicha, salchichón, jamón cocido, jamón serrano
Huevos	Yema
Lácteos	Leche en polvo, desnatada, queso parmesano, emmental
Verduras y hortalizas	Alcachofa, champiñón, col, brotes de soja, perejil
Frutas	Uva pasa, ciruela seca, higos secos, dátil seco, coco
Frutos secos	Piñón, almendra
Legumbres	Alubias blancas, lentejas, garbanzos, guisantes

Selección de alimentos con alto contenido en fósforo.

Tabla P35-2. ALIMENTOS A MODERAR POR SU ALTO CONTENIDO EN POTASIO (> 150-50 MG/100 G)

Grupo de alimento	Alimento
Cereales y derivados	Cereales para el desayuno, ricos en fibra, <i>muesli</i> , para el desayuno, pan integral, arroz y pasta integral
Carnes y pescados y derivados	Atún, <i>halibut</i> , lubina Conejo, pollo, jamón serrano, jamón cocido
Huevos	Huevo de gallina
Lácteos	Cuajada, flan, leche condensada, leche entera
Verduras y hortalizas	Espinaca, col de Bruselas, coliflor, alcachofa, zanahoria, espárrago, berenjena, tomate
Frutas	Ciruela, pasa, higo, plátano, grosella, uva, melón, kiwi
Frutos secos	
Legumbres	Alubia blanca, garbanzo, lenteja, guisante
Otros	Cacao soluble, en polvo, chocolate

Selección de alimentos con alto contenido en potasio. Modificado de Mataix Verdú J. *Tabla de composición de alimentos (2009)*, 5.ª ed. Universidad de Granada, Granada.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcázar R, Egocheaga I, Orte L, Lobos M, González Parra, Álvarez Guisasaola FJ, Górriz JL, Navarro JF, Martín de Francisco AL (2008). Documento de consenso SEN-semFYC sobre la enfermedad renal crónica. *Nefrología* 28 (3):273-282.
- De Luis D, Bustamante J (2008). Aspectos nutricionales en la insuficiencia renal. *Nefrología* 28(3):339-348.
- Mataix Verdú J (2009). Tabla de alimentos (5.ª ed.). Universidad de Granada, Granada.
- Muñoz M, Aranceta J, García Jalón I (2004). Intervención dietética. En "Nutrición aplicada y Dietoterapia", pp 99-111 (2.ª ed.). Eunsa, Pamplona.
- Ruperto López M, Barril Cuadrado G, Lorenzo Sellarres V (2008). Guía de nutrición en la Enfermedad Renal Crónica Avanzada (ERCA). *Nefrología* 3,79-86.
- Rusolillo y Marques (2008). Listas de intercambio "Sistema de intercambios para la confección de dietas y planificación de menús" https://www.easydiet.es/index.php?p=composicion_alimentos (último acceso abril-2010).



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

1. Rellenar la tabla con el número de intercambios que se quiera pautar en cada toma.

	Desayuno	Almuerzo	Comida	Merienda	Cena	Recena	inter-cambios	kcal	HC	Proteínas	Lípidos
Lácteos enteros											
Lácteos semidesnat.											
Lácteos desnatados											
Cereales											
Verduras y hortalizas											
Frutas											
Proteicos I											
Proteicos II											
Proteicos III											
Grasas											
Total											

2. Convertir el patrón fijo de intercambios en la dieta. Es decir, pasar los intercambios a alimentos con la ayuda de las tablas facilitadas en el Anexo del final de esta práctica.
3. Rellenar la siguiente tabla para comprobar, una vez calibrada la dieta, que se ajusta en cuanto al contenido en proteínas, sodio, potasio y fósforo con la dieta elaborada por intercambios.

		Dieta Base (por intercambios)	Dieta calibrada
Energía	kcal		
Proteínas	g		
Sodio	mg		
Potasio	mg		
Fósforo	mg		



COMENTARIOS

A large, empty rectangular area with a light blue gradient background, intended for users to write their comments or notes.

ANEXO. LISTAS DE INTERCAMBIO

Alimento	Peso neto	Medida culinaria	Sodio (mg)	Potasio (mg)	Fósforo (mg)
LÁCTEOS ENTEROS - 127 kcal, 7 g proteínas, 7 g lípidos, 9 g hidratos de carbono					
Cuajada	135	1 unidad	132,3	326,3	168,75
Leche entera	200	1 vaso	90	296	182
Yogur entero	250	2 unidades	212,5	452,5	190
LÁCTEOS SEMIDESNATADOS - 91 cal, 7 g proteínas, 3 g lípidos, 9 g hidratos de carbono					
Leche semidesnatada	200	1 vaso	92	332	170
LÁCTEOS DESNATADOS - 84 kcal, 9 g proteínas, 0 g lípidos, 12 g hidratos de carbono					
Leche desnatada	200	1 vaso	90	348	176
Yogur desnatado con frutas	250	2 unidades	120	380	240
Yogur desnatado entero	250	2 unidades	177,5	445	267,5
HORTALIZAS Y VERDURAS - 28,5 kcal, 2 g proteínas, 0,5 g lípidos, 4 g hidratos de carbono					
Acelga	100	1 plato mediano	225	567	64,5
Alcachofa	150	4 unidades medianas	22,5	225	64,5
Apio	150	2 unidades	165	457,5	48
Berenjena	150	½ unidad	4,5	393	31,5
Brócoli	150	1 plato pequeño	19,5	555	100,5
Calabacín	150	½ unidad pequeña	4,5	345	46,5
Cardo	150	1 plato pequeño en crudo	34,5	600	34,5
Cebolla	100	1 unidad pequeña	12	170	33
Coles de Bruselas	50	6 unidades crudas	45	205,5	38,5
Coliflor	150	1 plato pequeño crudo	63	478,5	72
Espárrago fresco	150	6 unidades finas	4,5	403,5	82
Espinacas	150	1 plato grande crudo	142,5	793,5	78
Guisante fresco	50	1 plato pequeño en crudo	4	150	63
Judía verde	150	1 plato pequeño	6	364,5	57
Lechuga	150	1 plato grande	33	357	36
Pepino	150	1 plato mediano	4,5	225	34,5
Pimiento	150	1 unidad mediana	4,5	253,5	30
Puerro	150	1 unidad grande	18	384	52,5
Tomate crudo maduro	150	1 unidad mediana	27	354	33
Zanahoria	100	1 unidad grande	70	286	16

ANEXO. LISTAS DE INTERCAMBIO (cont.)

Alimento	Peso neto	Medida culinaria	Sodio (mg)	Potasio (mg)	Fósforo (mg)
FRUTAS - 66,25 kcal, 1 g proteínas, 0,25 g lípidos, 15 g hidratos de carbono					
Albaricoque	245	5 unidades medianas	4,95	787,5	50
Cereza	145	1 plato pequeño	4,35	356,7	24,6
Ciruela	145	1 unidad mediana	0	342,2	42,05
Fresa/fresón	250	8 unidades medianas	5	380	57,5
Higos	160	3 unidades pequeñas	4,8	371,2	36,8
Kiwi	140	1 unidad mediana	4,2	341,6	42
Mandarina	170	2 unidades pequeñas	5,1	246,5	25,5
Manzana	130	1 unidad pequeña	9,1	156	11,7
Melocotón	320	1 unidad mediana	3,2	512	60,8
Melón	445	1 rodaja mediana	80,1	132,45	75,65
Membrillo	385	1 unidad mediana	11,5	770	73,15
Naranja	290	1 unidad grande	11,6	519,1	46,4
Pasas secas	20	16 unidades	4,6	156,6	17
Pera	158	1 unidad mediana	3,16	197,5	20,54
Piña sin piel	120	1 rodaja mediana	2,4	175,2	13,2
Plátano	165	1 unidad grande	1,65	635,25	36,3
Pomelo	380	1 unidad mediana	3,8	535,8	45,6
CEREALES Y DERIVADOS, TUBÉRCULOS - 68,5 kcal, 2 g proteínas, 0,5 g lípidos, 14 g hidratos de carbono					
Arroz blanco	20	1 cucharada sopera en crudo	1	19,6	20,4
Arroz integral	20	1 cucharada sopera en crudo	1,2	44,6	60,6
Cereales de desayuno ricos en fibra	25	4-5 cucharas soperas colmadas	225	287,5	205
Harina de trigo	20	1 cucharada sopera colmada	0,6	27	24
Harina integral	20	1 cucharada sopera colmada	0,8	70	66
Miñiz hervido en lata	80	4 cucharadas soperas	243,2	160	55,2
Pan blanco de barra	30	5-6 cm de largo	195	36	27
Pan blanco de molde	30	1 rebanada	183,6	38,7	273
Pan de trigo y centeno	30	5-6 cm de largo	139,5	39	34,2
Pan integral de barra	30	5-6 cm de largo	210	67,5	57,9
Pan rallado	20	2 cucharadas soperas	130	24	18
Pan tostado [biscotes]	20	2 unidades	70	32	26
Pasta alimenticia	20	2 cuch. soperas colmadas	1	47,2	21,4
Patata cruda	100	1 unidad pequeña	14	525	46

ANEXO. LISTAS DE INTERCAMBIO (cont.)

Alimento	Peso neto	Medida culinaria	Sodio (mg)	Potasio (mg)	Fósforo (mg)
LEGUMBRES - 88,5 kcal, 7 g proteínas, 0,5 g lípidos, 14 g hidratos de carbono					
Alubias rojas/negras	30	2 cucharadas soperas	4,2	515,4	141
Garbanzos	30	2 cucharadas soperas	11,7	300	93
Lentejas	30	2 cucharadas soperas	37,5	174,6	83,4
ALIMENTOS PROTEICOS I - 32,5 kcal, 7 g proteínas, 0,5 g lípidos, 0 g hidratos de carbono					
Jamón cocido magro/York	30	1 locha fina	242,7	84	72
Gallo	70		84	96	175
Lenguado	65		65	201,5	130
Lubina	45		31,5	153	186,75
Merluza en rodajas	45		39,15	124,2	75,15
Rape	55		22,5	156,2	181,5
Rodaballo	85		71,4	229,5	157,25
ALIMENTOS PROTEICOS II - 46 kcal, 7 g proteínas, 2 g lípidos, 0 g hidratos de carbono					
Cerdo lomo, crudo	30	1 rodaja pequeña	18,9	63,6	45,3
Conejo entero crudo	50	1 porción pequeña	33,5	180	106,5
Pollo muslo sin piel	45	1 muslo pequeño	34,2	135	85,95
Vaca/buey solomillo a la plancha	30		18	120	72
Jamón curado	30		912	100	93,2
Boquerón	50		52	165,5	91
Pez espada crudo	60		69,6	207,6	156,6
Sardina cruda	60		82,2	221,4	162
Trucha cruda	75		40,5	336,75	188,25
ALIMENTOS PROTEICOS III - 73 kcal, 7 g proteínas, 5 g lípidos, 0 g hidratos de carbono					
Huevo de gallina entero crudo	60	1 unidad pequeña	79,8	75	112,8
Queso fresco tipo Burgos	40	½ tarrina pequeña	108,8	48,4	68
Queso en porciones	30	2 unidades pequeñas	341,7	44,71	158,6
Queso en porciones	45	3 unidades o 3 quesitos	490,5	68,4	262,8

ANEXO. LISTAS DE INTERCAMBIO (cont.)					
Alimento	Peso neto	Medida culinaria	Sodio (mg)	Potasio (mg)	Fósforo (mg)
ALIMENTOS GRASOS - 45 kcal, 0 g proteínas, 0 g lípidos, 5 g hidratos de carbono					
Alimentos grasos ricos en ácidos grasos poliinsaturados					
Mayonesa light	15	1 cucharada sopera ras	112,5	15	7,5
Nueces	15	1 unidad grande	1,05	72	7,5
Alimentos grasos ricos en ácidos grasos monoinsaturados					
Aceite de oliva	5	1 cucharada de postre	0	0	0
Aguacate	80	Media unidad pequeña	5,6	417,6	35,2
Almendras	8	5-6 unidades pequeñas	0,8	61,36	42
Cacahuete	8	1 cucharada de postre	8,1	56	30
Alimentos grasos ricos en ácidos grasos saturados					
Mantequilla	5	1 cucharadita de postre	1,1	0,7	1,2
Nata líquida para cocinar 18% MG	20	¼ vasito pequeño	45,2	26	13

Tomado de Rusotillo y Marques (2008), Listas de intercambios para la confección de dietas y planificación de menús, http://www.casydiet.es/index.php?composicion_alimentos.

Adaptación y aplicación del cuestionario de conducta de alimentación infantil CEBQ

A. González y J. L. Santos Martínez

INTRODUCCIÓN

La conducta de alimentación es el conjunto de acciones que establecen la relación del ser humano con los alimentos, abarcando distintos aspectos: por un lado, deriva de la necesidad biológica de comer impulsada por las sensaciones de hambre generadas por señales hormonales provenientes de tejidos periféricos (leptina, insulina, ghrelina, entre otros) que se integran en el sistema nervioso central. Por otro lado, comer también es una fuente de placer, lo que condiciona la selección de alimentos según sus características organolépticas. Las experiencias placenteras (o las aversiones) relacionadas con la ingesta de ciertos alimentos pue-

den llevar a conductas reforzadas que se repiten a lo largo de los años. Finalmente, la alimentación además es un acto social que se basa en normas aceptadas, y que cumple un papel de medio de relación entre las personas de una misma cultura. La figura P36-1 muestra una representación no exhaustiva de la compleja red de condicionantes que actúan sobre la conducta de alimentación infantil.

Tradicionalmente, el estudio de los factores que influyen en el consumo de los alimentos se ha basado en la medición de la ingesta a través del uso de recordatorios o cuestionarios de frecuencia de consumo. Sin embargo, es necesario intentar comprender de mejor manera la relación habitual que tienen las personas con los ali-

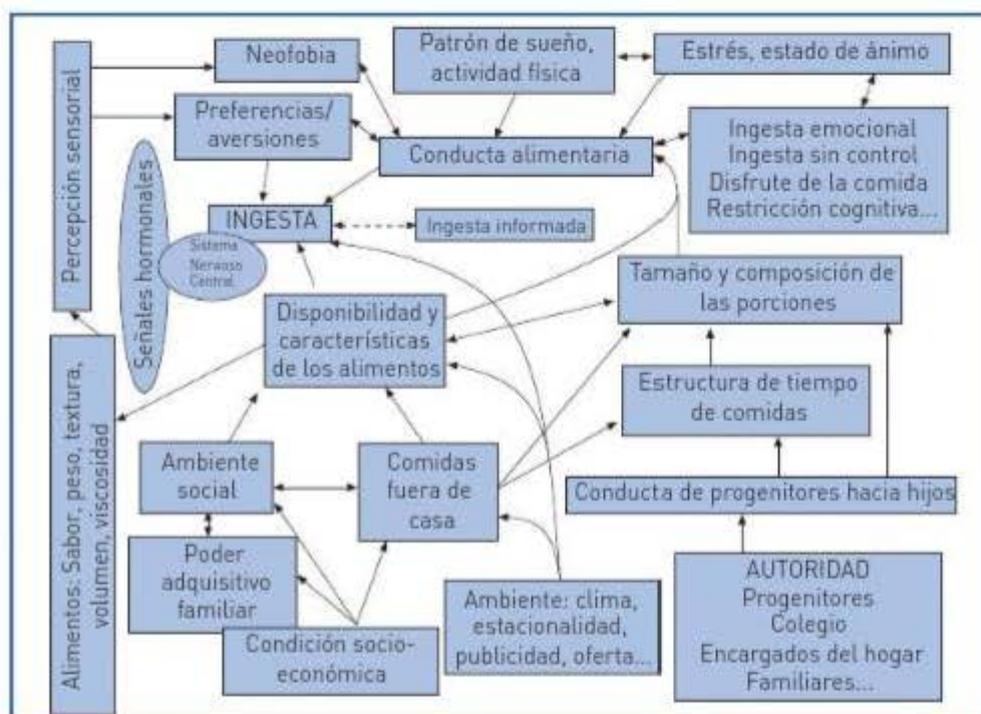


Figura P36-1. Ingesta y conducta de alimentación en la edad infantil.

mentos, y el papel que juega la conducta alimentaria en la obesidad y en la patogenia de los diferentes tipos de trastornos asociados a la alimentación.

CUESTIONARIO DE CONDUCTA DE ALIMENTACIÓN INFANTIL CEBQ

El cuestionario de alimentación infantil CEBQ (acrónimo del término en inglés *Child Eating Behaviour Questionnaire*) fue diseñado con el fin de evaluar la conducta alimentaria en la etapa infantil. CEBQ está siendo ampliamente utilizado en la literatura en la actualidad, habiendo mostrado una aceptable correlación con mediciones de ingesta, un alto grado de consistencia interna, una adecuada reproducibilidad, y una relativa estabilidad temporal durante la edad infantil.

El cuestionario completo CEBQ, adaptado al español de Chile, se muestra en la tabla P36-1 (con permiso del Prof. Wardle). CEBQ consta de 35 ítems agrupados en ocho dimensiones de la conducta de alimentación (Tabla P36-2). Los ítems consisten en afirmaciones sobre la conducta del niño que la madre responde en una escala tipo Likert desde 1 hasta 5. Entre las ocho dimensiones de la conducta que se miden en CEBQ, cuatro de ellas se refieren a inclinaciones positivas hacia la comida: disfrute de los alimentos (4 ítems: 2, 8, 10 y 14), respuesta a los alimentos (5 ítems: 19, 21, 23, 26 y 32), sobre-alimentación emocional (4 ítems: 5, 15, 20 y 30) y deseo de beber (3 ítems: 16, 18 y 24), mientras que las otras cuatro dimensiones evalúan inclinaciones negativas hacia la ingesta: respuesta a la saciedad (5 ítems: 6, 11, 29, 33 y 34), lentitud para comer (4 ítems: 1, 7, 17 y 27), subalimentación emocional (4 ítems: 9, 25, 31 y 35) y exigencia a los alimentos (6 ítems: 3, 4, 12, 13, 22 y 28). Los ítems 1, 4, 12, 28 y 34 tienen un tipo de puntuación reversa. CEBQ se aplica preferentemente mediante entrevista directa con la madre en presencia del niño en un entorno libre de distractores.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es aplicar el cuestionario de conducta de alimentación infantil CEBQ.

ADAPTACIÓN CULTURAL Y CÁLCULO DE PUNTAJES DEL CEBQ

Procedimiento

En nuestro grupo de investigación, CEBQ fue inicialmente traducido y adaptado al español de Chile, en un proceso que incluyó dos traductores independientes (traducción directa y reversa), evaluación de la concordancia de versiones, un estudio piloto del cuestionario en diez dúos niño/a y sus madres y finalmente una revisión en profundidad por parte de un grupo de expertos. En el estudio piloto, se interrogó a las madres sobre la existencia de palabras que pudieran ser de difícil comprensión y sobre afirmaciones poco adecuadas o poco precisas, invitando a reformular los ítems con sus propias palabras. La revisión por parte de expertos cambió la manera de formular varios ítems y en algunos casos también la manera de plantear la escala Likert. Por esta razón, se procedió a cambiar el orden de algunos ítems con el fin de facilitar la comprensión del cuestionario.

Una vez que se obtiene la versión final, se debe corroborar la concordancia en la estructura de dimensiones (factores) en relación al cuestionario original mediante un análisis exploratorio factorial. En nuestra adaptación, hemos observado que una estructura de siete dimensiones (combinando las dimensiones "Respuesta de saciedad" y "Lentitud en comer") se adecuaba mejor a los datos que las ocho dimensiones originales. Sin embargo, hemos preferido mantener el mismo formato del cuestionario original con el fin de preservar la comparabilidad con la literatura internacional. Asimismo, también debe evaluarse la consistencia interna de cada dimensión a través de la estadística alfa de Cronbach.

Para cada dimensión de la conducta, se calcula el puntaje crudo total sumando los puntos obtenidos en cada ítem. Para estandarizar los puntajes en una escala de 1 a 5, se dividen los puntos totales de cada dimensión entre el número de ítems de esa dimensión.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Representación gráfica de puntajes de conducta de alimentación

Una forma de representar la conducta de alimentación evaluada mediante el CEBQ, es a través

Tabla P36-1. CUESTIONARIO DE COMPORTAMIENTO DE ALIMENTACIÓN INFANTIL

Por favor, responda a las siguientes afirmaciones que se corresponden con el comportamiento de su hijo/a hacia la alimentación

	Nunca	Rara vez	Algunas veces	Frecuentemente	Siempre
1. Mi hijo/a termina su comida rápidamente	<input type="checkbox"/>				
2. Mi hijo/a tiene interés en las comidas y los alimentos	<input type="checkbox"/>				
3. Mi hijo/a rechaza los alimentos que no conoce cuando se le ofrecen por primera vez	<input type="checkbox"/>				
4. Mi hijo/a disfruta cuando hay una gran variedad de alimentos	<input type="checkbox"/>				
5. Mi hijo/a come más cuando está preocupado	<input type="checkbox"/>				
6. Mi hijo/a deja comida en el plato al término del almuerzo y/o la comida	<input type="checkbox"/>				
7. Mi hijo/a demora más de 30 minutos para terminar un almuerzo o una comida	<input type="checkbox"/>				
8. Mi hijo/a espera ansiosamente las horas de la comida	<input type="checkbox"/>				
9. Mi hijo/a come menos cuando está enojado	<input type="checkbox"/>				
10. Mi hijo/a disfruta comiendo	<input type="checkbox"/>				
11. Mi hijo/a se satisface fácilmente con la comida	<input type="checkbox"/>				
12. Mi hijo/a está interesado en probar alimentos que no ha probado antes	<input type="checkbox"/>				
13. Mi hijo/a decide que no le gusta una comida, aún antes de haberlo probado	<input type="checkbox"/>				
14. A mi hijo/a le encanta comer	<input type="checkbox"/>				
15. Mi hijo/a come más cuando está molesto	<input type="checkbox"/>				
16. Mi hijo/a está siempre pidiendo algo para beber	<input type="checkbox"/>				
17. Mi hijo/a come lentamente	<input type="checkbox"/>				
18. Si se le diera la oportunidad, mi hijo/a estaría siempre tomando algo de beber	<input type="checkbox"/>				
19. Mi hijo/a está siempre pidiendo comida	<input type="checkbox"/>				
20. Mi hijo/a come de más cuando no tiene nada que hacer (aburrido)	<input type="checkbox"/>				

Tabla P36-1. CUESTIONARIO DE COMPORTAMIENTO DE ALIMENTACIÓN INFANTIL (cont.)

	Falso	General- mente falso	Neutro	General- mente cierto	Sí, siempre
21. Si fuera por él (ella), mi hijo/a comería todo el tiempo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
22. Mi hijo/a es difícil de dar en el gusto con la comida	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
23. Incluso cuando está satisfecho, mi hijo/a está dispuesto a comer su comida favorita	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
24. Si se le diera la oportunidad, mi hijo/a estaría tomando líquidos todo el día	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
25. Mi hijo/a come menos cuando está cansado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
26. Si se le diera la oportunidad, mi hijo/a estaría siempre comiendo algo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
27. Mi hijo/a come cada vez más lento durante el transcurso del almuerzo o la comida	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
28. Mi hijo/a disfruta probando nuevos alimentos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
29. Mi hijo/a está satisfecho antes de terminar su comida	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
30. Mi hijo/a come más cuando está ansioso	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
31. Mi hijo/a come menos cuando está triste	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
32. Si se lo permitiera, mi hijo comería en exceso	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
33. Mi hijo/a no puede almorzar o cenar si ha comido algo antes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
34. Mi hijo/a tiene un gran apetito	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
35. Mi hijo/a come más cuando está contento/a	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

de gráficos multidimensionales (Fig. P36-2). En este gráfico, se representan en la parte superior los puntajes estandarizados de las cuatro dimensiones proingesta, y en la parte inferior, los puntajes de las cuatro dimensiones antiingesta. Se puede observar que los puntajes de las dimensiones proingesta generan un polígono en la parte superior del

gráfico mientras que los puntajes de las dimensiones antiingesta generan un polígono en la parte inferior. El área de cada uno de estos polígonos (calculada mediante la suma del área de los triángulos que lo conforman) representa un índice de las inclinaciones positivas o negativas hacia la ingesta. Adicionalmente, el ratio de las áreas de

Tabla P36-2. DIMENSIONES DE LA CONDUCTA DE ALIMENTACIÓN INFANTIL EN EL CEBQ

Dimensión	Definición
Disfrute de los alimentos	Condición asociada positivamente con la sensación de hambre, el deseo de comer y el placer por el alimento.
Respuesta frente a los alimentos	Susceptibilidad a preferir alimentos de mejores propiedades organolépticas en contextos habituales.
Sobrealimentación emocional	Tendencia a incrementar la ingesta en contextos emocionales negativos.
Deseo de beber	Deseo de beber y tendencia a llevar a mano bebidas generalmente azucaradas.
Respuesta de saciedad	Disminución de la sensación de hambre ocasionada por el consumo de alimentos.
Lentitud para comer	Tendencia a comer más lentamente en el curso de una comida y a prolongar sus tiempos de duración.
Subalimentación emocional	Tendencia a reducir la ingesta en contextos emocionales negativos.
Exigencia frente a los alimentos	Exigencia condicionada que limita la gama de los productos de alimentación que son aceptados.

Adaptación cultural y cálculo de puntajes del CEBQ.

ambos polígonos puede entregar una información de la conducta de alimentación del niño, que puede ser comparada con la de otros niños o con las de un grupo de niños. A modo de ejemplo, el área del polígono superior en la figura P36-2 es aproximadamente de 1,5 (unidades arbitrarias) y la del polígono inferior es de 0,6, lo que entrega un ratio de áreas de 2,5.

Es importante señalar que el área de los polígonos y el cociente de áreas son índices útiles para describir e interpretar los datos multidimensionales de conducta de alimentación. Sin embargo, estos índices no son adecuados para analizar los datos, dado que el cambio de orden de los factores en el gráfico lleva a cambios en su forma y cambios en las áreas calculadas.

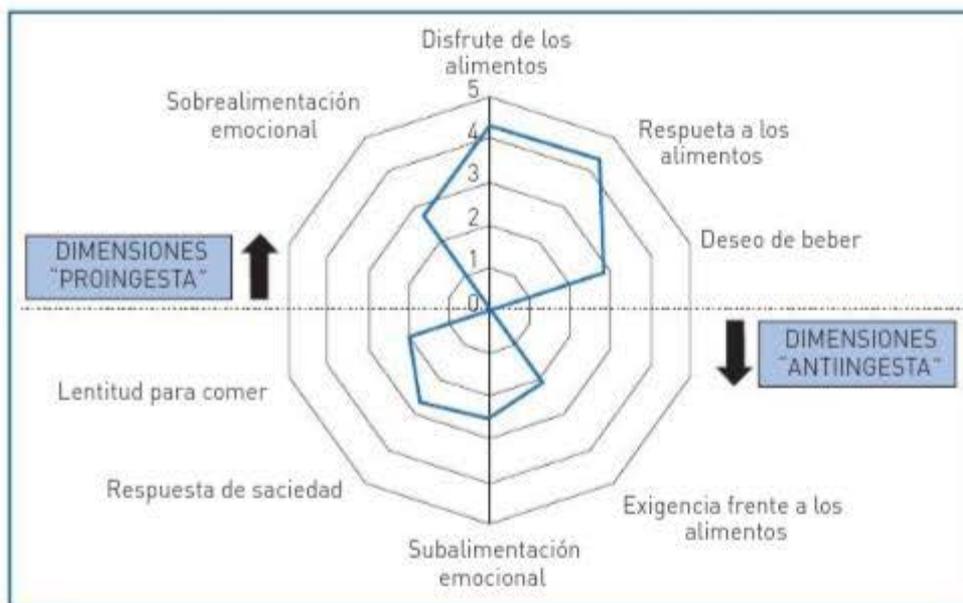


Figura P36-2. Gráfico multidimensional de la conducta de la alimentación infantil medida a través del CEBQ.

Aplicación de la evaluación de conducta de alimentación en la población infantil

Las variaciones individuales de la conducta alimentaria podrían contribuir en el desarrollo de estados de desnutrición, sobrepeso y obesidad, siendo factores de riesgo modificables que podrían ser el foco de intervenciones de salud encaminadas a la prevención de la obesidad. Esta estrategia preventiva adquiere importancia al considerar que en la actualidad la obesidad está alcanzando niveles de epidemia tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, y representando un importante problema de salud pública que no muestra signos de mejoría a corto plazo y cuyo tratamiento a largo plazo no ha demostrado ser sustentable. En este sentido, se ha planteado que los niños obesos tendrían una menor respuesta a señales de saciedad interna, una respuesta incrementada frente a las características externas de los alimentos, una tendencia a comer en mayor cantidad como respuesta a estímulos emocionales y una tendencia a comer más rápidamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Bland J, Altman D (2002). Validating scales and indexes. *Br Med J* 324:606-607.
- Domínguez-Vásquez P, Olivares S, Santos JL (2008). Influencia familiar sobre la conducta alimentaria y su relación con la obesidad infantil. *Arch Latinoam Nutr* 58:249-255.
- Sleddens FC, Kremers SPJ, Thijs C (2008). The Children's Eating Behaviour Questionnaire: factorial validity and association with Body Mass Index in Dutch children aged 6-7. *Int J Behav Nutr Phys Act* 5:49.
- Valladares M, Domínguez-Vásquez P, Obregón AM, Weisstaub G, Burrows R, Maiz A, Santos JL (2010). Melanocortin-4 receptor gene variants in Chilean families: association with childhood obesity and eating behavior. *Nutr Neurosci* 13:71-78.
- Wardle J, Guthrie C, Sanderson S, Rapoport L (2001). Development of the Children's Eating Behaviour Questionnaire. *J Child Psychol Psychiatr* 42:963-970.
- Webber L, Hill C, Saxton J, Van Jaarsveld CHM, Wardle J (2009). Eating behaviour and weight in children. *Int J Obes* 33:21-28.

COMENTARIOS



37. Papel del sistema nervioso central y sistema gastrointestinal en la regulación del apetito
38. Determinación de los niveles plasmáticos de leptina e insulina
39. Valoración de las interacciones fármaco-nutriente a partir de material bibliográfico
40. Determinación del estado oxidativo celular y/o tisular: actividad SOD, producción del anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ e hidroperóxidos
41. Cultivos celulares: análisis de la diferenciación de adipocitos 3T3-L1
42. Aislamiento, manejo y estudios en mitocondrias hepáticas
43. Aplicaciones de los isótopos estables en la nutrición y en el diagnóstico clínico
44. Proteómina: técnicas de electroforesis y Western-Blot
45. Investigación con RNA y técnicas de PCR
46. Nutrigenética y epigenética: técnicas de SNP y MSP
47. Diferenciación del perfil metabólico de individuos mediante una estrategia metabolómica no dirigida

Papel del sistema nervioso central y sistema gastrointestinal en la regulación del apetito

A. Solomon Edwards y M. Marquès Feliú

INTRODUCCIÓN

Un hecho relevante en la regulación del metabolismo y balance energético es la existencia de una interacción multifactorial entre estímulos aferentes (nutricionales, nerviosos, endocrinos y metabólicos), provenientes del sistema gastrointestinal (SGI) o del tejido adiposo, y órdenes eferentes, producidos por el sistema nervioso central (SNC) en respuesta a las señales periféricas, que establecen un equilibrio entre el apetito y la saciedad y contribuyen a ajustar el gasto energético (Fig. P37-1).

El SNC y el SGI constituyen un complejo extrínseco bidireccional comunicado mediante múltiples conexiones neuronales y endocrinas, tanto a nivel central como periférico. La estimulación de las neuronas correspondientes produce reflejos viscerales que a través del tallo cerebral regulan tanto funciones gastrointestinales como la sensa-

ción de hambre y la homeostasis energética. En este complejo sistema también juega un importante papel el tejido adiposo, sintetizando gran cantidad de hormonas relacionadas con el metabolismo y peso corporal que se liberan al sistema circulatorio generando impulsos nerviosos a regiones del cerebro, produciendo un sistema complejo de señales promovidas por la situación nutritiva y metabólica (Fig. P37-2).

Dentro del SNC, el hipotálamo recoge señales neuronales y provenientes del sistema circulatorio, condicionando la expresión de neuropéptidos activadores del apetito u orexigénicos e inhibidores del apetito o anorexigénicos, importantes reguladores de la ingesta y peso corporal. En este contexto, este complejo sistema homeostático está ajustado tanto a corto como a largo plazo, por factores de índole variada. Así, el apetito o la saciedad son regulados a corto plazo mediante factores nutricionales (exposición repetida a

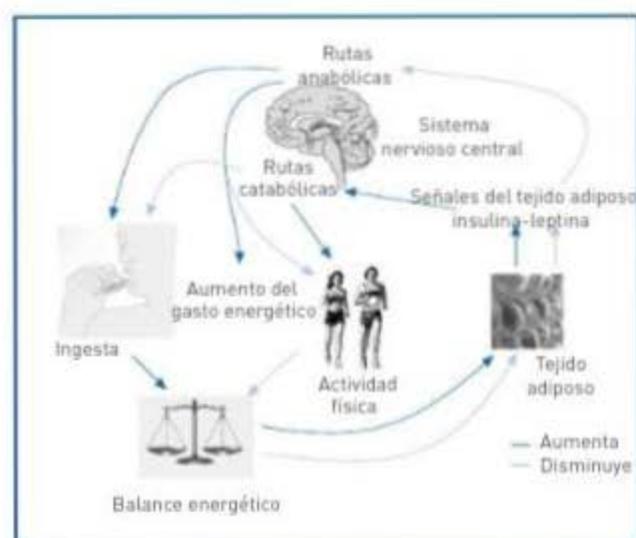


Figura P37-1. Regulación del balance energético.

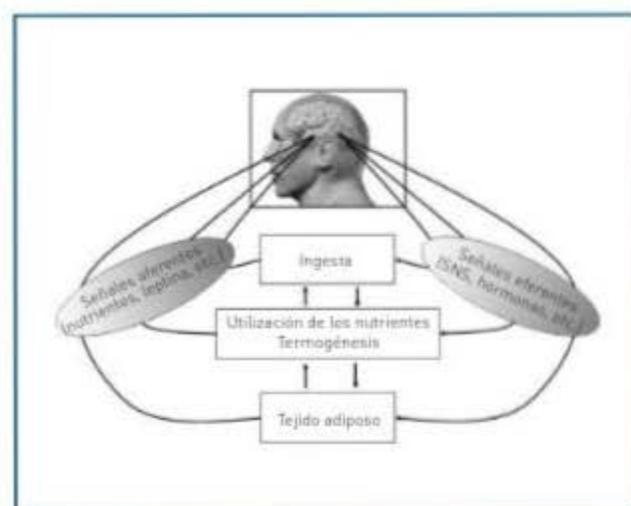


Figura P37-2. Regulación de la ingesta: mecanismos implicados.

alimentos, tipo y cantidad de alimentos, etc.) y señales fisiológicas, entre las que se encuentran algunos factores estimulantes de la ingesta, como puede ser una hipoglucemia producida por un estado de ayuno, o por mecanismos de saciedad, producidos por la llegada de alimentos al estómago. Por otro lado, la regulación a largo plazo, donde el organismo establece una serie de mecanismos, tiene como principal objetivo el mantenimiento estable del peso y de la composición corporal. De todas formas, estas dos categorías de señales no son excluyentes, ya que existen factores hormonales como la insulina, la leptina o la ghrelina, que participan en señales a corto y largo plazo, afectando conjuntamente a la ingesta y el gasto energético.

La ingesta alimentaria involucra distintos aspectos del comportamiento, como pueden ser el hambre, el entorno de la comida y la decisión de empezar a comer. La complejidad de la sensación de hambre se demuestra en la diversidad de hormonas, neuropéptidos, neurotransmisores y áreas cerebrales que entran en juego.

Así, el hipotálamo es la principal zona del SNC que acoge la señalización y regula este proceso, en el que están involucrados diferentes mediadores y regiones cerebrales. Concretamente, el núcleo arqueado (ARC) o "centro activador" del hipotálamo juega un papel importante en el control de la ingesta, debido a la presencia de neuronas que poseen receptores específicos y que además descansan cerca de la barrera hematoencefálica, por lo que son altamente accesibles a se-

ñales generadas por la leptina, insulina y ghrelina. Desde el ARC se proyectan fibras nerviosas a otras regiones importantes como el núcleo paraventricular (PVN) o "centro integrador", el hipotálamo lateral (LH) o "centro del hambre" y el ventromedial (VMH) o "centro de la saciedad" (Fig. P37-3). Dependiendo de la situación nutricional, todas estas áreas hipotalámicas sintetizan neuropéptidos que producen diversas señales que a través de conexiones neuronales regulan la ingesta y la homeostasis energética.

También las señales de saciedad generadas por mecano y quimiorreceptores provenientes del tracto gastrointestinal y órganos ajenos afectan a la ingesta de alimento, influyendo sobre el apetito mediante la activación de neuronas del hipotálamo, y éste a su vez, estimula a la ingesta de alimento, cesando la respuesta al sentido del gusto y de la vista, produciendo saciedad y rechazo a los alimentos.

En resumen, las señales nutricionales, nerviosas, endocrinas y metabólicas producidas por los distintos órganos y sistemas que regulan la homeostasis energética se liberan en respuesta a la situación nutricional y metabólica en que se encuentra el organismo. La integración de este conglomerado de estímulos contribuye al mantenimiento estable del peso y la composición corporal a través de la regulación del balance energético, en el que interactúa el SGI y el SNC mediante señales nerviosas y hormonales específicas.

OBJETIVO

Los objetivos que se plantean en la presente práctica son, por un lado, analizar *in vivo* los efectos producidos por la administración de insulina (hipoglucemia) sobre la ingesta y los niveles de glucosa. En segundo lugar, se pretende analizar los niveles glucémicos de ghrelina y estudiar la posible interacción de la ghrelina con la señalización orexigénica mediada por la disponibilidad de glucosa.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Es evidente que los nutrientes ingeridos y las señales nerviosas de distensión abdominal afec-

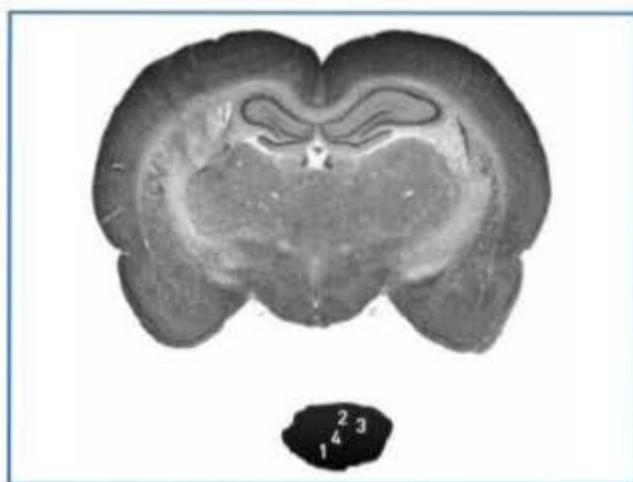


Figura P37-3. Corte transversal de cerebro de rata. La zona oscura corresponde al hipotálamo. 1. Núcleo arqueado, 2. núcleo paraventricular, 3. hipotálamo lateral y 4. núcleo ventromedial.

tan a la expresión de péptidos que regulan la sensación de hambre, el metabolismo energético y el peso corporal. Moléculas como la glucosa produce señales sobre el SNC, así, por ejemplo, un estado de hipoglucemia promueve la activación de neuronas orexigénicas y glucosensitivas localizadas en el hipotálamo estimulando la ingesta de alimentos. La insulina es una hormona sintetizada en las células beta del páncreas, considerada como pieza clave en la regulación de la homeostasis glucostática y energética. La insulina posee un doble efecto sobre la ingesta y peso corporal: a nivel central posee un efecto anorexigénico, en cambio periféricamente disminuye los niveles de glucosa en sangre generando una señal orexigénica.

Por otro lado, la ghrelina es una hormona, sintetizada principalmente en el estómago, que en el ayuno o hipoglucemia presenta altos niveles de expresión, mientras que están disminuidos tras una sobrealimentación y en la obesidad.

Material y equipos

Muestras y/o material biológico

- Rata Wistar macho 200-250 g.

Equipos

- Balanza.
- Glucómetro y tiras de glucosa.
- Contador Gamma.

Material

- Ghrelin RIA Kit (Linco Research).
- Jaula de polipropileno y serrín.
- Tubos de ensayo.
- Jeringuilla.

Reactivos

- Triton X-100 0,05%.
- EDTA 0,025 M
- Azida sódica 0,08%.
- Insulina.

Protocolo

1. Inyectar subcutáneamente suero salino con insulina (10 IU/kg) en la rata Wistar.
2. Tras 4 h, se registra la ingesta y los niveles de glucosa. La ingesta se cuantifica anotando la cantidad de pienso introducido en la jaula al principio del experimento y a las 4 h. La glucosa se determina mediante un método basado en la química seca, utilizando un glucómetro, obteniendo sangre directamente de la cola de los animales.
3. A su vez, extraer sangre de la rata para realizar el análisis de ghrelina plasmática. Para determinar la ghrelina en sangre pipetear 100 μ L de los estándares y de los controles, 100 μ L de las muestras a cuantificar y añadir 100 μ L de SBF (excepto a los tubos de CT).
4. Realizar el buffer de ensayo y añadir 300 μ L a los tubos de NSB, 200 μ L a los Bo y 100 μ L al resto. Además, 100 μ L de Ac a todos los tubos (excepto a los de NSB y CT).
5. Agitar los tubos e incubar a temperatura ambiente y oscuridad durante 20-24 h.
6. Tras las horas de incubación añadir 100 μ L del trazador 125 I-ghrelina a todos los tubos y vortear, volver a incubar durante 20-24 h a temperatura ambiente y oscuridad.
7. Añadir 1 mL de reactivo precipitante a todos los tubos (excepto al de CT) e incubar durante 20 minutos a 4 °C.
8. Transcurrido este tiempo, centrifugar a 3.000 g a 4 °C durante 20 minutos. El reactivo precipitante se une al complejo 125 I-ghrelina-anticuerpo formando un pellet.
9. Absorber el sobrenadante con mucho cuidado para no romper el precipitado y medir la radiactividad en el contador gamma.

Cálculos

La cuantificación de ghrelina presente en las muestras se realiza mediante una recta patrón. En ella se representa el porcentaje de unión de la ghrelina marcada con el anticuerpo (% G) frente a concentraciones conocidas de ghrelina. El porcentaje de unión se calcula mediante la siguiente fórmula, siendo Bo (blanco) la unión total de 125 I-ghrelina-anticuerpo.

$$\% G = (\text{Concentraciones estándar/Bo}) \times 100$$

Añadir en los tubos Bo ^{125}I -ghrelina, anticuerpo y suero bovino fetal (SBF), con lo que se calcula la unión máxima de la ^{125}I -ghrelina al anticuerpo. Añadir el SBF a todos los tubos para evitar reacciones inespecíficas del anticuerpo con algún compuesto plasmático. Es necesario conocer también la unión inespecífica (NSB, *Non Specific Binding*), es decir, la cantidad de ^{125}I -ghrelina no se une al anticuerpo, por lo que en los tubos NSB se añade únicamente ^{125}I -ghrelina y SBF.

Por último se determinará las cuentas totales (CT) en los tubos a los que se añadió exclusivamente ^{125}I -ghrelina, cuantificando la cantidad de radioactividad emitida por la ^{125}I -ghrelina mediante un contador gamma (DPC Gamby).

BIBLIOGRAFÍA

- de Castro JM (2009). When, how and what foods are eaten are related to total daily food intake. *British Journal of Nutrition* 102:1228-1237.
- Dietrich MO, Horvath TL (2009). Feeding signals and brain circuitry. *Eur J Neurosci* 30:1688-96.
- Leibowitz SF, Wortley KE (2004). Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 25:473-504.
- Solomon A, Martínez JA (2006). Participación del sistema nervioso y del tracto gastrointestinal en la homeostasis energética. *Rev Med Univ Navarra* 50:27-37.
- Solomon A, De Fanti BA, Martínez JA (2007). Peripheral Ghrelin interacts with orexin neurons in glucostatic signalling. *Regul Pept* 144:17-24.
- Woods SC, D'Alessio DA (2008). Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab* 93:37-50.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



	Pienso inicial (g)	Pienso tras 4 h (g)	Glucemia tras 4 h (mg/dL)
Rata 1			
Rata 2			
Rata 3			

COMENTARIOS



Determinación de los niveles plasmáticos de leptina e insulina

M. Fernández-Galilea, S. Lorente-Cebrián y M. J. Moreno-Aliaga

INTRODUCCIÓN

La leptina es una hormona secretada por el tejido adiposo blanco y que circula en plasma en una concentración proporcional a la grasa corporal. Fundamentalmente, es producida y secretada al torrente sanguíneo por el tejido adiposo blanco por lo que se le considera una adipoquina, aunque se ha observado que se expresa en otros tejidos tales como estómago, músculo esquelético, cartilago fetal, pituitaria, tejido mamario, hipotálamo y placenta. Esta adipoquina actúa en los centros nerviosos hipotalámicos controlando la ingesta y regulando el gasto energético. En condiciones de ingesta excesiva, la leptina actúa reduciendo el apetito y promoviendo un balance energético negativo mediante un incremento de la tasa metabólica, es decir, un aumento del consumo de oxígeno, la termogénesis y la actividad locomotora, como mecanismo compensatorio para evitar una excesiva ganancia de peso corporal. Por tanto, cualquier alteración tanto en su producción como en la sensibilidad a ella, conducen a modificaciones en el peso de los individuos. De hecho, la deficiencia de leptina provoca hiperfagia y obesidad severa tanto en animales como en humanos. Sin embargo, la mayor parte de los sujetos obesos presentan hiperleptinemia, y se ha sugerido que está asociada a una cierta resistencia a la acción de esta hormona.

La insulina es una proteína que se sintetiza en las células β de los islotes de Langerhans pancreáticos en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre. Tras la ingesta, la insulina estimula la captación de glucosa desde la sangre por el tejido muscular, hepático y adiposo hasta que vuelve a sus niveles normales. En este sentido, la insulina

también estimula el almacenamiento de energía en forma de grasas en los adipocitos a partir del exceso de glucosa circulante.

Las alteraciones en la producción o en la acción de la insulina conducen al desarrollo de diabetes mellitus, distinguiéndose dos tipos: la diabetes mellitus tipo 1 causada por una deficiencia en la secreción pancreática de insulina y la diabetes mellitus tipo 2 producida por una deficiencia en la acción de la insulina en los tejidos diana (resistencia a la insulina).

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es la determinación de los niveles plasmáticos de las hormonas leptina e insulina mediante la técnica ELISA (*Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay*).

PROCEDIMIENTO

Fundamento

La técnica que se va a utilizar en la presente práctica para la determinación de los niveles plasmáticos de leptina e insulina es la de ELISA tipo sándwich. Esta técnica está basada fundamentalmente en la detección de un antígeno (leptina o insulina) presente en la muestra a analizar, mediante la reacción con anticuerpos específicos (antileptina o antiinsulina) que se encuentran inmovilizados sobre una fase sólida. Posteriormente, la detección del complejo antígeno-anticuerpo se realiza mediante la adición de anticuerpos específicos del antígeno (antileptina o antiinsulina) con-

jugados con una enzima, de tal forma que la adición del sustrato específico de esa enzima pone en marcha una reacción enzimática cuyo producto (generalmente de color) puede ser cuantificado espectrofotométricamente (Fig. P38-1).

Esta técnica presenta diversas ventajas, como son su versatilidad, sencillez, uso de reactivos económicos y alta fiabilidad. La determinación de los niveles plasmáticos de leptina e insulina mediante ELISA ha tenido una gran aplicación en diagnóstico clínico. De esta forma, se puede conocer de forma rápida, sencilla y fiable los niveles plasmáticos de dichas hormonas y contribuir al diagnóstico de patologías relacionadas con las hormonas en estudio, como por ejemplo la diabetes mellitus tipo 2. Además, debido a su fiabilidad y sencillez, también, permite la monitorización y control de los niveles plasmáticos de las hormonas en estudio a lo largo del tiempo y permiten un mejor ajuste de la terapia.

Sin embargo, la mayor limitación que presenta esta técnica, en algunas ocasiones, es su baja sensibilidad. En este sentido, se están desarrollando diversos métodos de amplificación de la reacción, como por ejemplo, luminiscencia, lo que permite aumentar considerablemente su sensibilidad.

Material y equipos

Equipos

- Agitador Vortex.
- Agitador orbital de placas.
- Espectrofotómetro lector de placas 2.

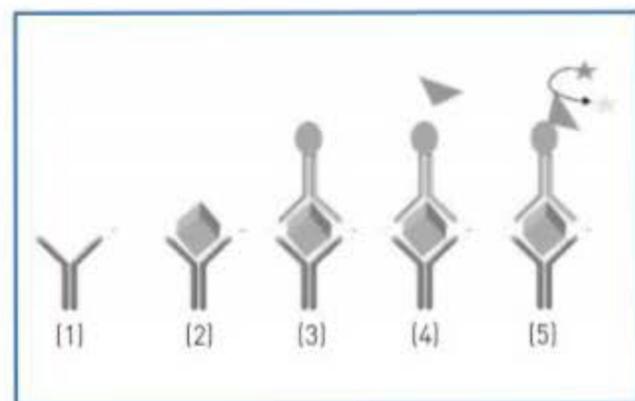


Figura P38-1. Esquema representativo de los procesos que tienen lugar durante la realización del test de ELISA para la cuantificación de los niveles plasmáticos de leptina e insulina.

Material

- Kit comercial para la determinación de leptina/insulina mediante la técnica ELISA.
- Micropipetas y puntas con capacidad para 10-20 μL y 20-200 μL .
- Pipeta multicanal y puntas con capacidad para 50-300 μL .
- Cubetas contenedor para pipeteador.

Reactivos

- Agua destilada.
- Anticuerpos antileptina/antiinsulina.
- Buffer de lavado 10X (Tris salino 50 mM con Tween-20).
- Estándares para leptina y/o insulina:
 - Insulina: 0,2; 0,5; 1; 2; 5 y 10 ng/mL.
 - Leptina: 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 y 30 ng/mL.
- Controles 1 y 2.
- Buffer de ensayo fosfosalino pH 7,4.
- Anticuerpos biotinilados de detección para insulina/leptina.
- Solución enzimática conjugada de estreptavidina-peroxidasa de rábano.
- Sustrato: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.
- Solución de parada (HCl 0,3 M).

Protocolo

1. Para realizar la determinación de los niveles plasmáticos de leptina e insulina, se añaden las muestras (suero o plasma) en las cuales queremos analizar los niveles de leptina o insulina, a los pocillos de la placa de ELISA en la que están fijados los anticuerpos monoclonales anti-leptina o anti-insulina, en presencia del buffer fosfosalino. Tras un período de incubación, las moléculas de leptina o insulina presentes en las muestras reaccionan específicamente con los anticuerpos monoclonales antileptina o antiinsulina.
2. Tras este período de incubación, se realizan lavados con el buffer de lavado 1X para eliminar los antígenos (leptina o insulina) que no hayan reaccionado y los restos de muestra no fijados y se añaden anticuerpos biotinilados antileptina o antiinsulina, que se unirán a las moléculas

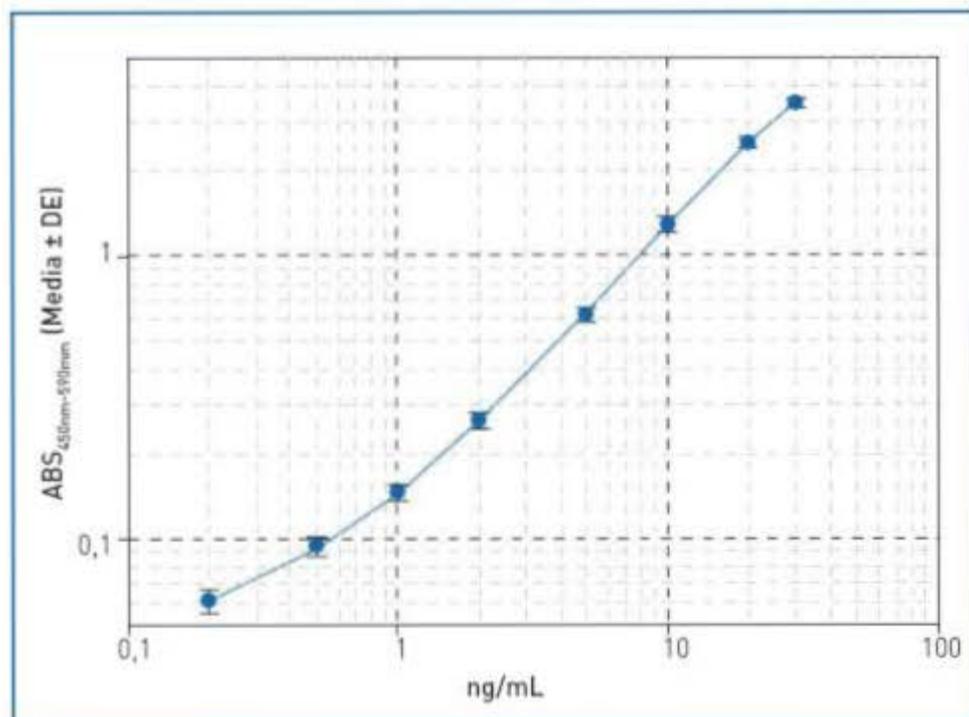


Figura P38-2. Modelo de recta patrón para la interpolación de los datos obtenidos tras la realización de la técnica ELISA.

las de leptina o insulina previamente inmovilizadas en la placa.

- De nuevo se realizan lavados para eliminar el exceso de anticuerpos libres que no hayan reaccionado y se añade una solución enzimática con el fin de que la estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano presente en esa solución se una a los anticuerpos biotinilados anteriormente inmovilizados.
- Tras un período de incubación, se elimina mediante lavados el exceso de la enzima, y se cuantifica la actividad de los conjugados anticuerpo-enzima inmovilizados a la placa en presencia del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, mediante la lectura espectrofotométrica de la absorbancia de los productos de la reacción acidificados con la solución de parada a 450 nm y su posterior corrección mediante la absorbancia a 590 nm (Fig. P38-2). El aumento de la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de leptina o insulina presente en la muestra.

Cálculos

Valores de referencia

En individuos con peso normal, los valores de leptina se sitúan entre 1-15 ng/mL mientras que

estos valores pueden dispararse hasta niveles superiores a 30 ng/mL en individuos con sobrepeso u obesidad.

La determinación de los niveles de insulina se utiliza para el diagnóstico de diabetes mellitus. Niveles plasmáticos de insulina inferiores a 2 μ U/mL son compatibles con un cuadro de diabetes tipo 1 en la que existe una deficiencia de las células β -pancreáticas para la producción de dicha hormona. Sin embargo, niveles de glucosa en sangre superiores a 126 mg/dL, generalmente acompañados de niveles de insulina superiores a 16 μ U/mL son indicativos de un cuadro de diabetes tipo 2 donde las células de tejidos diana de la insulina (músculo, hígado y tejido adiposo) presentan cierto grado de resistencia a la acción de la insulina para la captación de la glucosa a su interior.

BIBLIOGRAFÍA

- Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS (2010). The role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med* 152:93-100.
- Sousa M, Brás-Silva C, Leite-Moreira A (2009). The role of leptin in the regulation of energy balance. *Acta Med Port* 22(3):291-8.
- Tripathy D, Chavez AO (2010). Defects in insulin secretion and action in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 10:184-91.

**PRESENTACIÓN DE RESULTADOS**

	Pienso inicial (g)	Pienso tras 4 h (g)	Glucemia tras 4 h (mg/dL)
Rata 1			
Rata 2			
Rata 3			

**COMENTARIOS**

Area for comments or observations.

Valoración de las interacciones fármaco-nutriente a partir de material bibliográfico

M. A. Zulet Alzórriz y A. Martí del Moral

INTRODUCCIÓN

La interacción fármaco-nutriente se define como la modificación en la respuesta farmacológica de un medicamento originada por la presencia de alimentos. Existen diferentes formas de clasificar las interacciones fármaco-nutriente, en general se engloban en farmacocinéticas y farmacodinámicas. El mecanismo se debe a la presencia en los alimentos de sustancias que contrarrestan o potencian el efecto de los fármacos. En este sentido, una de las interacciones más estudiadas por su relevancia clínica y que está relacionada con una interacción a nivel del metabolismo es la que ocurre por la ingestión de alimentos o bebidas ricas en tiramina durante el tratamiento con medicamentos inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO), con síntomas muy graves de hipertensión severa, hemorragia cerebral y muerte. Otro ejemplo, en este caso a nivel de la absorción de fármacos, es la administración de tetraciclinas junto con alimentos que contienen calcio y magnesio (leche, yogur, queso, etc.), se produce una disminución en la absorción del medicamento derivada de la formación de quelatos con dichos iones.

También se incluyen en este concepto las alteraciones en el aprovechamiento de los nutrientes por la administración de determinados medicamentos. Así, la absorción de los nutrientes por el organismo depende de numerosos factores que a su vez pueden ser modificados por los medicamentos como son, entre otros, la motilidad gastrointestinal, la acción de determinadas enzimas digestivas y el pH. Entre los ejemplos que se describen en este grupo son las interacciones entre antibióticos y la vitamina K, ya que disminuye la síntesis bacteriana de esta vitamina; o la presencia

de aceites minerales que dificultan la absorción de las vitaminas liposolubles.

De igual modo, la interacción fármaco-nutriente contempla el estado nutritivo del individuo, dado que la situación fisiopatológica condiciona la ingesta de alimentos y la eficacia y seguridad de los fármacos.

Por ello, el estudio de las interacciones fármaco-nutriente aborda el estado nutricional previo, los medicamentos prescritos y la historia dietética del individuo. Los grupos que requieren mayor vigilancia son: ancianos debido a la polimedicación y los posibles déficits nutricionales, enfermos crónicos con tratamientos continuados, pacientes con alteración hepática o renal, pacientes que reciben medicamentos con margen terapéutico estrecho y aquellos medicamentos que necesitan concentraciones plasmáticas sostenidas para ser eficaces.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica consiste en conocer las principales interacciones nutriente-fármaco, con el fin de evitar modificaciones en la respuesta farmacológica derivadas de la presencia de un alimento/componente en la dieta, así como las interacciones fármaco-nutriente que pueden comprometer el estado nutritivo del individuo.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

A partir de documentación científica sobre el tema, se completarán tres tablas que recogen las

principales interacciones fármaco-nutriente en ambas direcciones, tal y como se muestra en el apartado de la presentación de resultados.

Material

- Material bibliográfico.
- Base de datos Pubmed.

Protocolo

1. En primer lugar se recomienda consultar bibliografía general sobre los alimentos/componentes de los alimentos que afectan a la absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos, así como los medicamentos que dificultan la utilización de los nutrientes.
2. A continuación y con la ayuda de bases de datos se pasará a profundizar en cada tipo de interacción.

BIBLIOGRAFÍA

- Mataix V, Matas A (2009). Interacciones de medicamentos con alimentos y alcohol. En "Nutrición y alimentación humana. Tomo I: Nutrientes y alimentos". Mataix J, pp. 654-665. (2.ª ed.). Ediciones Ergon, Madrid.
- Lasheras B (2004). Bases farmacocinéticas de las interacciones fármaco-nutrientes. En "Nutrición aplicada y dietoterapia". Muñoz M, Aranceta J y García-Jalón I. pp. 1197-1208. (2.ª ed.). Eunsa, Pamplona.
- Medina R, Martí A (2005). Farmacoterapia más frecuente e interacciones con los alimentos. En "Libro blanco de la alimentación de los mayores". Muñoz M, Aranceta J, Guijarro JL. pp. 199-204. Editorial Médica Panamericana, Madrid.
- Haken V (2001). Interacciones entre fármacos y nutrientes. En "Nutrición y Dietoterapia de Krause". Mahan, LK, Escott-Stump, S. pp. 397-413. (10.ª ed.). McGraw-Hill Interamericana, México.
- Sánchez E, Zulet MA, Martínez JA (2010). Influencia del estado nutricional sobre el efecto de los fármacos. En "Libro de Farmacología para Nutricionistas". Editorial Médica Panamericana. Pendiente (en prensa).
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



INTERACCIONES DE ALIMENTOS CON MEDICAMENTOS

Alimentos/bebida	Medicamentos	Interacción	Recomendación
Leche y productos lácteos (calcio)			
Quesos, adobados, ahumados, patés de hígado, higos, nata, conservas (tiramina)			
Bacón, conservas, aperitivos (sodio)			
Plátanos, higos (potasio)			
Dieta rica en fibra			
Dietas proteicas			
Dieta pobre en proteínas			
Dieta grasa			
Vegetales verdes, brócoli, espárragos (vitamina K)			
Tomates, jugos de frutas, cafeína (acidez)			
Zumo de pomelo (flavonóides)			
Cafeína			
Alcohol			

EFECTO DE LOS MEDICAMENTOS SOBRE LA UTILIZACIÓN DE NUTRIENTES

Medicamentos	Alimentos	Interacción	Recomendación
Antiácidos			
Anticancerosos			
Antibióticos			
Diuréticos			
Aceite mineral			
Antiulcerosos			
Anticonvulsivantes			
Contraceptivos orales			
Hipocolesterolemiantes			

INTERACCIONES CONCRETAS

Medicamentos	Alimentos	Interacción	Recomendación
Griseofulvina			
Sales de litio			
Norfloxacino			
Warfarina			
Eritromicina			
Digoxina			
Clorpromacina			
Levodopa			
Tetraciclina			
Penicilina			
Cimetidina			
Teofilina			
IMAO			
Tiamina			



COMENTARIOS

A large, empty light blue rectangular area intended for user comments or annotations.

Determinación del estado oxidativo celular y/o tisular: actividad SOD, producción del anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ e hidropéroxidos

P. L. Prieto-Hontoria, P. Valdecantos Jiménez de Andrade y P. González-Muniesa

INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son sustancias que, en presencia de un sustrato oxidable, retrasan o previenen la oxidación del mismo, es decir, su alteración al entrar en contacto con el oxígeno. En el organismo existen diferentes sistemas de defensa antioxidante que actúan contra el daño producido por las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los radicales libres. Un ejemplo de sistema de defensa antioxidante son los compuestos con grupos tioles en su composición, entre los que destaca el glutatión reducido (GSH) que al mantener el equilibrio con su forma oxidada (GSSG) mantiene el equilibrio redox celular. La producción de ROS y de especies reactivas de nitrógeno (RNS) en el organismo es necesaria para un correcto mantenimiento de las funciones celulares y se encuentran en equilibrio con los sistemas antioxidantes celulares. Una de las especies altamente reactivas es el anión superóxido, siendo la más dañina para las estructuras celulares, aunque presenta una vida media muy baja. Este anión puede transformarse en hidroxipéroxido a través de una reacción de dismutación o por reacciones enzimáticas de detoxificación, la reactividad de esta molécula es la menor de todas las ROS si bien su vida media es la más elevada. La principal enzima antioxidante es la superóxido dismutasa (SOD) en sus dos isoformas, citosólicas y mitocondrial, la catalasa y la glutatión peroxidasa. La SOD transforma el anión superóxido, desarrollando un papel protector frente al ataque de estos radicales libres a compuestos con grupos tioles como el GSH.

Existen alimentos con un alto contenido en antioxidantes, entre ellos pueden destacarse las

frutas y verduras, el aceite de oliva o el vino tinto. Los antioxidantes exógenos presentes en estos alimentos son: vitamina E, vitamina C y vitamina A o β -caroteno, minerales con capacidad antioxidante (selenio, zinc, cobre y manganeso). Por último, tendríamos diferentes agentes fitoquímicos como el ácido lipoico, el resveratrol, catequinas y otros compuestos fenólicos. Diversos estudios metabólicos y químicos han determinado las propiedades de los antioxidantes contenidos en los diferentes alimentos.

El uso de antioxidantes en el campo clínico para el tratamiento y la prevención de múltiples patologías relacionadas en su origen o desarrollo con un aumento del estrés oxidante ha cobrado especial relevancia en los últimos años. De hecho, la suplementación de la dieta con vitaminas antioxidantes en enfermedades neurodegenerativas está ampliamente respaldada por estudios científicos. En los últimos años también se están llevando a cabo diferentes investigaciones sobre el posible papel de la suplementación con diferentes antioxidantes dietéticos o mezclas de los mismos en la mejoría y prevención de la obesidad.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica consiste en determinar el estado oxidativo en muestras biológicas (células y/o tejido) a partir de la determinación de la producción del anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ e hidroxipéroxidos por quimioluminiscencia, así como la medida de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD).

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Determinación de la producción del anión superóxido $O_2^{\bullet-}$ e hidroxiperóxidos por quimioluminiscencia

Esta técnica de medida se basa en la emisión de radiación electromagnética producida por una reacción química. En el proceso de quimioluminiscencia directa, dos reactivos, normalmente un sustrato y un oxidante, reaccionan para formar un producto intermedio de la reacción que pasa a un estado electrónicamente excitado, para relajarse a continuación hasta el estado fundamental con emisión de un fotón, responsable de la emisión de luz. Para la detección del anión superóxido se utiliza como reactivo la lucigenina por su especificidad y su alta sensibilidad en la detección de esta especie reactiva (Fig. P40-1). La determinación de hidroxiperóxidos se basa en el mismo fundamento pero con diferente reactivo, en este caso se utiliza el luminol (Fig. P40-2).

Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD se puede medir a través de un kit comercial basado en un análisis co-

lorimétrico. El anión superóxido tiene una vida media muy corta, en este ensayo se genera el anión $O_2^{\bullet-}$ a través de la reacción de la xantina con el oxígeno generando agua y ácido úrico por acción de la xantino oxidasa (XOD) (Fig. P40-3). El anión $O_2^{\bullet-}$ generado transforma el reactivo WST-1 en WST-1 formazan que absorbe luz a una longitud de onda de 450 nm. La SOD reduce la concentración de anión $O_2^{\bullet-}$, transformándolo en H_2O_2 , disminuyendo la formación de WST-1 formazan. Esta reducción en la cantidad de WST-1 formazan producido es una medida indirecta de la actividad SOD.

Material y reactivos

Muestras

- Células o tejidos.

Equipos

Determinación de la producción del anión superóxido $O_2^{\bullet-}$ e hidroxiperóxidos por quimioluminiscencia

- Agitador orbital de placas.
- Luminómetro.
- Placas de luminiscencia de 96 pocillos.

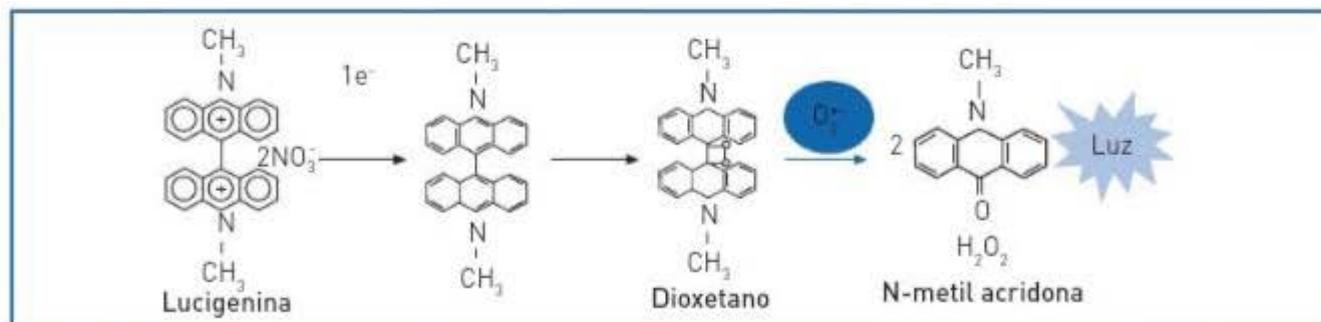


Figura P40-1. Esquema de la reacción de quimioluminiscencia para la detección de anión superóxido.

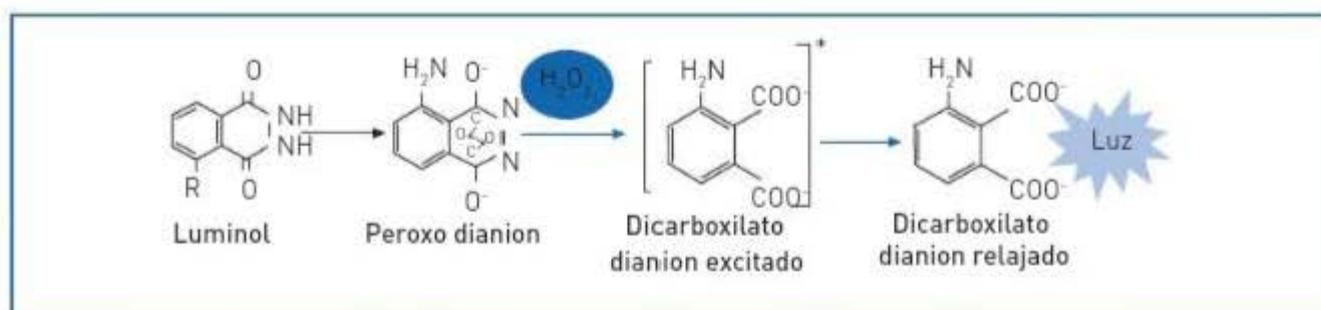


Figura P40-2. Esquema de la reacción de quimioluminiscencia para la detección de hidroxiperóxido.

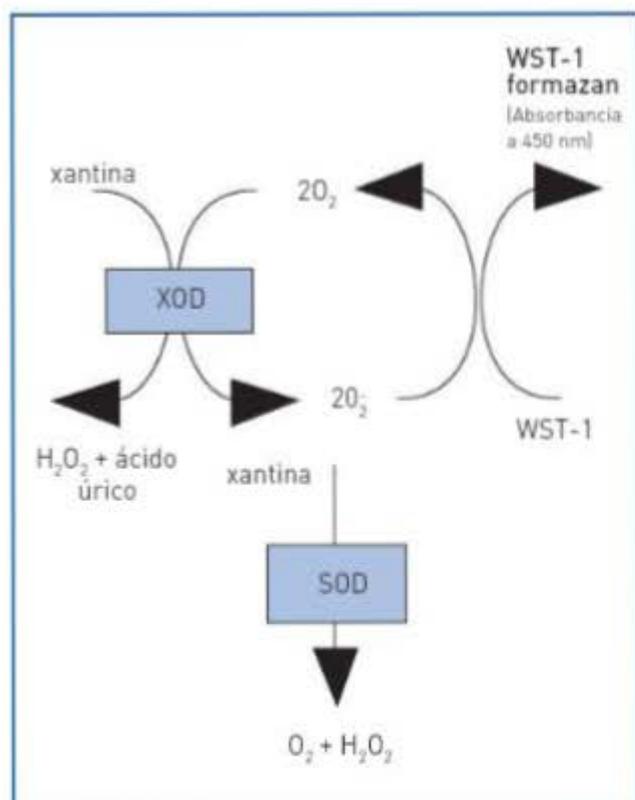


Figura P40-3. Esquema de las reacciones para la medida de actividad superóxido dismutasa (SOD).

Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

- Agitador orbital de placas.
- Espectrofotómetro de placas.
- Placas de espectrofotometría de 96 pocillos.

Reactivos

Determinación de la producción del anión superóxido O₂⁻ e hidroxiperóxidos por quimioluminiscencia

- Lucigenina 0,5 mM o Luminol 0,25 mM.
- Succinato 40 mM.
- Medio (pH 7,4): sacarosa desionizada 70 mM, manitol 250 mM, KH₂PO₄ 2,5 mM, MgCl₂ 2,5 mM, EDTA 0,5 mM, HEPES 2 mM, BSA (99%) 0,1% (p:v), agua MilliQ.

Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

- Superóxido dismutasa ⇒ actividad de 50 U/μL.
- Buffer SOD 10X.
- Xantino oxidasa.
- Reactivo WST-1.

- Succinato 5 mM.
- Agua MilliQ.

Protocolo

Determinación de la producción del anión superóxido O₂⁻ e hidroxiperóxidos por quimioluminiscencia

Para la determinación de O₂⁻ se diluyen las muestras (células o tejido) en medio pH 7,4, descrito anteriormente, hasta alcanzar una concentración de 0,5 mg/mL. Previa cuantificación de la cantidad de proteína por el método Bradford. Posteriormente se determina la cinética de producción estimulada por succinato (5 mM por pocillo) durante 80 minutos, tras la adición de lucigenina a una concentración por pocillo de 50 μM. La concentración de proteína por pocillo fue de 0,1 mg. Todas las determinaciones se recomienda se hagan por triplicado. El protocolo para medir los hidroxiperóxidos sigue el mismo esquema, pero en vez de añadir lucigenina, se añade luminol.

Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

Si se quiere diferenciar las isoformas citosólica y mitocondrial de SOD se puede inhibir la isoforma citosólica mediante el tratamiento con una solución cloroformo-etanol (37,5-62,5 v/v).

Se realizan tres diluciones para las muestras (células o tejido) con o sin tratamiento en buffer SOD 1X hasta alcanzar concentraciones de 1, 25 y 75 μg proteína por pocillo. Paralelamente se realiza una curva de SOD con el estándar suministrado por el fabricante según las instrucciones del kit. Se añade succinato (5 mM) a la reacción. Los diferentes reactivos se prepararan siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se mide la cinética de inhibición de la formación de WST-1 formazan a 450 nm durante 15 min con la ayuda de un espectrofotómetro.

Cálculos

Para la obtención de valores fiables y reproducibles se aconseja realizar cada medición por triplicado y calcular una media aritmética con las tres medidas. Esa media se interpola en la recta de calibrado obtenida con los estándares del kit.

En las mediciones es importante tener en cuenta el límite de detección de cada kit.

BIBLIOGRAFÍA

Cadenas E, Packer L (2002). Handbook of Antioxidants: Second Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc. USA.

Frankel EN (2007). Antioxidants in food and biology: Facts and Fiction. The Oily Press, England.

Pérez-Matute P, Zulet MA, Martínez JA (2009). Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. *Curr Opin Pharmacol* 9(6):771-779.

Valdecantos MP, Pérez-Matute P, Martínez JA (2009). Obesity and oxidative stress: role of antioxidant supplementation. *Rev Invest Clin* 61(2):127-139.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Determinación de la producción del anión superóxido O_2^- e hidroxiperóxidos por quimioluminiscencia

Se representa con un diagrama de barras, en el cual el eje X es el tiempo de incubación y el eje Y es AUC (*Arbitrary Units of Chemiluminescence*) o RLU (*Relative Light Units*). La interpretación de los datos del anión superóxido e hidroxiperóxidos consistirá en analizar si se produce un aumento o disminución en la producción de dichas moléculas.

Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

Se expresa en U/mL respecto al tiempo de incubación, incluyendo el error estándar de la media de los triplicados. La interpretación de los datos de la actividad de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) radica en examinar si existe un aumento o inhibición de la actividad de la enzima respecto a los diferentes tiempos de tratamiento del ensayo.

COMENTARIOS



Cultivos celulares: análisis de la diferenciación de adipocitos 3T3-L1

I. Churruga Ortega, J. Miranda Gómez y A. Lasa Elgezua

INTRODUCCIÓN

Los “cultivos celulares” abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular, además de aportar una serie de ventajas frente a modelos *in vivo* como la caracterización y homogeneidad de la muestra y la economía. El empleo de cultivos celulares permite identificar mejor los efectos directos de un ingrediente dietético o de un fármaco sobre un determinado tejido diana aislado, al descartar posibles influencias indirectas de otros tejidos del organismo, así como de cambios endocrinos. Es decir, se trata de una metodología mediante la cual se puede obtener información muy detallada sobre los mecanismos de acción de moléculas *in vitro*, para así poder extrapolar e identificar mejor sus objetivos y dianas *in vivo*. Además, la utilización de cultivos celulares permite analizar procesos de gran importancia como la diferenciación de células inmaduras a maduras.

La línea celular seleccionada para esta práctica es la 3T3-L1. Se trata de una línea celular ampliamente utilizada en la investigación biológica del tejido adiposo, como modelo *in vitro* de adipocito, puesto que bajo las condiciones adecuadas se diferencia en adipocito.

La adipogénesis es el proceso de diferenciación mediante el cual células precursoras multipotenciales dan origen a células adiposas maduras. Ocurre por la activación de un programa coordinado de expresión génica mediado por factores de transcripción, el cual conduce a la formación de una célula especializada, no sólo en almacenar y movilizar el exceso de grasa acumulada en forma de triglicéridos (TG), sino también en cumplir un papel endocrino importante para la homeostasis del organismo.

OBJETIVO

Esta práctica persigue adquirir destreza en el manejo y el cultivo de células 3T3-L1 y estudiar el proceso de diferenciación de preadipocito a adipocito maduro. El proceso se evaluará mediante la observación por microscopía óptica de los cambios morfológicos de las células, que van adquiriendo una forma redondeada, y de forma cuantitativa mediante la determinación directa de TG.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

En esta práctica se analizará la adipogénesis. Para ello, se estudiarán las características de células 3T3-L1 en diferentes estadios del proceso de maduración de preadipocito a adipocito maduro de modo cualitativo y cuantitativo.

Para trabajar con las células 3T3-L1, inicialmente son necesarios los procesos de descongelación, siembra y cultivo de preadipocitos. Una vez obtenido el número de muestras necesarias, se iniciarán los procesos de diferenciación y maduración de preadipocitos a adipocitos maduros, mediante la incubación de las células con compuestos proadipogénicos que promueven la acumulación de gotas de lípidos en el citoplasma de las células maduras.

Material y equipos

Muestras biológicas

- Células 3T3-L1, adquiridas de la *American Type Culture Collection* (ATCC).

Equipos

- Campana de flujo laminar con luz UV.
- Incubador con atmósfera 5% CO₂/95% aire.
- Tanque de N₂ líquido.
- Microscopio óptico.
- Espectrofotómetro.
- Campana de extracción.
- Bomba de vacío (succión).
- Centrífuga.
- Baño termostatzado.

Material

- Succionador de pipetas.
- Pipetas estériles de 5, 10 y 25 mL.
- Micropipetas y puntas estériles.
- Flasks de 175 cm².
- Placas de cultivo de 6 pocillos.
- Tubos de polipropileno de 50 mL.
- Pipetas Pasteur autoclavazas.
- Tubos Eppendorf.
- Placas de 96 pocillos.
- Filtros.
- Porta, cámara Neubauer y cubre.
- Guantes de latex.
- Kit de TG.
- Kit de proteínas.

Reactivos

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* 4,5 g/L Glucose).
- Suero bovino fetal (*Fetal Calf Serum*, FCS).
- Antibióticos (penicilina/estreptomicina).
- Ácido pantoténico.
- Biotina.
- Dexametasona.
- 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX).
- Insulina.
- Dimetil sulfóxido (DMSO).
- Tripsina/EDTA 10X.
- Solución VIRKON.
- Isopropanol.
- n-hexano.
- NaOH (0,3 N).
- Sodio dodecil sulfato (SDS, 0,1%).
- Etanol (70%).
- Tritón X-100.
- PBS 1X.
- Agua destilada.

Protocolo

El trabajo con células se realiza siempre en campana de flujo laminar con luz UV.

Para cualquier tipo de procedimiento se enciende la lámpara de luz UV 15 minutos antes de empezar a trabajar. A continuación se limpia toda la superficie de trabajo con Virkon y luego con etanol al 70%. Todo el material que va a ser introducido en la campana ha de ser estéril y desechable, y en el caso de material no desechable, como las micropipetas por ejemplo, se deben rociar con etanol al 70%. Siempre se trabaja con guantes.

Preparación de medios

Dependiendo de la fase de diferenciación y maduración celular, antes de trabajar, es necesario preparar los medios de cultivo que se presentan en la tabla P41-1. Es importante recordar que a la hora de hacer la mezcla, cada uno de los componentes ha de ser filtrado dentro de la campana.

Descongelación de células y siembra en flask

Las células congeladas se mantendrán en viales en N₂ líquido, en un medio a base de DMEM y DMSO. Antes de sacar el vial conviene tener preparado el siguiente material en la campana de flujo laminar:

- Un tubo de polipropileno de 50 mL que contiene 20 mL de medio de preadipocitos (atemperado a 37 °C).
- El succionador de pipetas y pipetas de 25 y 10 mL.
- Flask de 175 cm² con una adecuada identificación (nombre, pasaje celular, fecha y tipo de células).

A continuación, se toma un vial de células del tanque de N₂ líquido e inmediatamente se introduce en un baño a 37 °C durante 2 min. Una vez transcurrido este tiempo el vial, que se mantiene en la palma de la mano, se rocía con etanol (70%) y se introduce en la campana. Se le añade 1 mL de medio de preadipocitos y se vierte todo el contenido del vial en el tubo de polipropileno, que

Tabla P41-1. COMPOSICIÓN DE LOS DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO A UTILIZAR EN ESTA PRÁCTICA

Medio de cultivo	Preadipocitos	Inducción diferenciación	Adipocitos maduros
DMEM	1X	1X	1X
FCS	10%	10%	10%
Biotina	5%	5%	5%
Ácido pantoténico	5%	5%	5%
Penicilina/estreptomicina	5%	5%	5%
Insulina	-	10 µg/mL	0,2 µg/mL
IBMX	-	0,5 mM	-
Dexametasona	-	0,25 µM	-

contendrá 20 mL de medio. Se vuelve a repetir la misma operación. Se mezcla 4-5 veces todo el volumen del tubo de polipropileno con la pipeta de 25 mL, con objeto de obtener una suspensión celular homogénea. Finalmente se recoge todo el volumen con la pipeta, se vierte con suavidad en el flask de 175 cm² y se mueve suavemente para que la suspensión se distribuya por la base del flask, asegurando una correcta distribución de los preadipocitos por la misma. Se cierra el flask y se introduce en el incubador a 37 °C con el tapón sin cerrar completamente.

Nota: Es importante evitar en todo momento el contacto del medio de cultivo y el tapón del flask, minimizando así el alto riesgo de contaminación que existe debido a las condiciones de incubación.

Cambio de medio

24 horas después se debe renovar el medio de los preadipocitos, ya que el medio usado para la congelación contiene DMSO. Este compuesto, si bien protege las células durante el proceso de congelación, puede resultar tóxico para las células una vez se hayan descongelado.

Para ello, antes de sacar el flask del incubador, conviene tener preparado el siguiente material en la campana:

- Medio de preadipocitos precalentado a 37 °C.
- Una pipeta Pasteur unida a una bomba de succión.

Nota: Cuando se enciende la bomba de succión, se debe desinfectar el tubo con etanol al 70%. A continuación se introduce en la campana y se une a la pipeta Pasteur. Igualmente después de su uso, será conveniente desinfectarlo una vez más utilizando en primer lugar la solución Virkon y en segundo lugar etanol al 70%.

- El succionador de pipetas y una pipeta de 25 mL.

Para cambiar el medio se succiona en primer lugar todo el medio sucio que contiene el flask. Para ello, es importante poner el flask en posición vertical y succionar el medio con la pipeta Pasteur desde una esquina, asegurándose de que no se tocan las células vivas que estarán adheridas a la base del flask. A continuación, se hace un lavado añadiendo 10 mL de medio limpio a la misma esquina, agitándolos por la superficie del flask y volviendo a retirarlos por succión. Finalmente, se añaden otros 20 mL de medio de preadipocitos, se cierra el flask y se vuelve a introducir en el incubador con el tapón sin cerrar completamente.

Este procedimiento de cambio de medio se repite una vez cada dos días.

En el momento de la siembra, las células presentan una forma redondeada antes de adherirse a la base del flask. Sin embargo, cuando se adhieren, los preadipocitos adquieren una forma alargada, lo que permite realizar un control de la siembra de forma visual (Fig. 41-1).

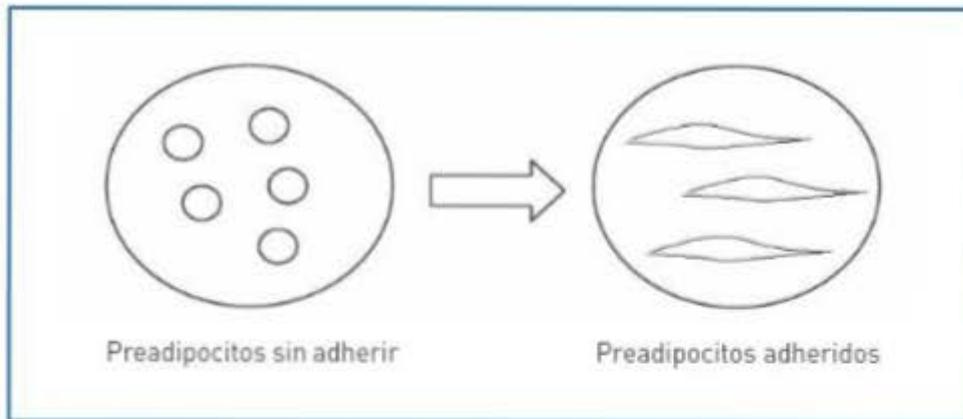


Figura P41-1. Morfología de preadipocitos sin adherirse y adheridos a la base del flask.

Pasaje de flask a flask

El crecimiento celular debe ser controlado visualmente. Con la ayuda de un microscopio, se observará principalmente la confluencia celular, es decir, la densidad de células por cm^2 de superficie. Así, cuando se observe que las células han alcanzado un 50-60% de confluencia se debe realizar un nuevo pasaje, en el que todas las células de ese flask son nuevamente sembradas en otros 2 flasks.

Para ello, se prepara una vez más el siguiente material en la campana antes de empezar a trabajar:

- Medio de preadipocitos precalentado a 37°C .
- Una pipeta Pasteur unida a la bomba de succión.
- El succionador de pipetas y pipetas de 25, 10 y 5 mL.
- Tripsina.
- PBS 1X.
- Tubo de polipropileno de 50 mL.
- 2 flask de 175 cm^2 con la identificación adecuadamente escrita.

En primer lugar, se succiona todo el medio sucio que contiene el flask del mismo modo que en el paso anterior ("Cambio de medio") y se realiza un lavado de las células con 10 mL de PBS 1X. A continuación, se añaden 3 mL de tripsina por toda la superficie del flask, se cierra y se introduce en el incubador durante 3 minutos. La tripsina es una enzima que rompe las uniones de las células a la superficie del flask facilitando la separación de las mismas. Una vez transcurrido este tiempo se saca el flask del incubador y se comprueba al microscopio que las células se

hayan despegado. Para agilizar este proceso se puede golpear suavemente el flask con la mano. Cuando se observe que todas las células se han despegado se puede seguir trabajando en la campana.

Se añaden al flask 7 mL de medio de preadipocitos y, con la ayuda de la pipeta, se succiona y se libera este volumen dentro del flask una y otra vez para asegurarnos de que recogemos adecuadamente todas las células. Por último, se recoge todo el volumen (10 mL) y se introduce en un tubo de polipropileno de 50 mL.

Se centrifugan las células a 1.200 rpm, durante 3 min, manteniendo una temperatura de trabajo de 21°C .

Nota: Mientras las células están en la centrifuga, se cargan 15 mL de medio de cultivo en cada uno de los nuevos flask.

Una vez finalizada la centrifugación, se retira el sobrenadante del tubo de polipropileno y se añaden 10 mL de medio de preadipocitos limpio a los adipocitos que han quedado precipitados. Se agita con la pipeta para conseguir una resuspensión celular homogénea. Finalmente, se recoge todo el volumen de suspensión celular y se añaden 5 mL en cada uno de los flask nuevos. Se reparte suavemente todo el volumen por la base del flask para asegurar una distribución homogénea de los preadipocitos por toda la superficie. Se cierra el flask y se introduce en el incubador a 37°C con el tapón sin cerrar completamente.

Este paso se puede repetir tantas veces como sea necesario. Al final, cuando ya se haya creado un banco de células suficiente, algunas se congelarán y otras se usarán para pasarlas a placa y poder así realizar los tratamientos necesarios.

Pasaje de flask a placa

Para pasar las células de flask a placa, se debe preparar el siguiente material en la campana antes de empezar a trabajar:

- Medio de preadipocitos precalentado a 37 °C.
- Una pipeta Pasteur unida a la bomba de succión.
- El succionador de pipetas y pipetas de 25, 10 y 5 mL.
- PBS 1X.
- Tripsina.
- Tubo de polipropileno de 50 mL.
- Placas de 6 pocillos con la identificación adecuadamente escrita.

El primer paso de este procedimiento es similar al observado en el apartado anterior. Las células deben ser lavadas, despegadas, centrifugadas y resuspendidas del mismo modo que se ha descrito en el apartado anterior ("Pasaje de flask a flask").

Una vez obtenida la suspensión celular dentro del tubo de polipropileno, es conveniente realizar un conteo de células antes de la siembra en placa, ya que es importante asegurarse de que el número de células sembradas por pocillo sea de 25.000 a 50.000 células.

Contaje de células

Se utilizará una cámara de Neubauer que consiste en una porta con una cámara en la que se observan dos superficies, A y B, que contienen a su vez cuatro cuadrículas en las cuales se realiza el conteo.

Se limpia en primer lugar el porta y cubre con etanol al 70%. Posteriormente se cargan 10 μ L de suspensión celular en la cámara de Neubauer. Se observa el porta al microscopio y se cuentan las células de 4 cuadrículas en la superficie A y otras 4 en la superficie B.

Se calcula la media de los conteos y se extrapola esta cantidad de células perteneciente a 10 μ L a la cantidad que habrá en 1.000 μ L (n.º de células/mL). Después se extrapola la cantidad total de células que tenemos en la suspensión del tubo de polipropileno.

Siembra en placa

Según los resultados obtenidos en el conteo de células, se calcula la cantidad de medio de pre-

adipocitos a añadir en el tubo de polipropileno para que la carga celular sea correcta en cada uno de los pocillos (25.000-50.000 células/pocillo) y teniendo en cuenta que en cada pocillo se cargará como máximo un volumen total de 2 mL.

Una vez añadido el volumen de medio de cultivo necesario en el tubo, se agita con la pipeta para conseguir una resuspensión celular homogénea. Se recoge todo el volumen y se añaden 2 mL en cada uno de los pocillos distribuyéndolos de forma homogénea por la superficie de los pocillos. Se cubre la placa con la tapa y se introduce en el incubador.

El medio de preadipocitos se renueva una vez cada dos días, hasta que se alcance el 100% de confluencia en cada uno de los pocillos. Una vez llegados a este punto, se debe esperar dos días de postconfluencia para la inducción de la diferenciación.

Para esta práctica se deberán haber destinado al menos 3 placas de 6 pocillos para realizar la medida de TG los días 2, 6 y 12 de diferenciación.

Inducción de la diferenciación

Antes de sacar las placas del incubador, conviene tener preparado el siguiente material en la campana:

- Medio de diferenciación precalentado a 37 °C.
- Una pipeta Pasteur unida a la bomba de succión.
- El succionador de pipetas y una pipeta de 10 mL.

Para cambiar el medio de cultivo se succiona en primer lugar todo el medio sucio que contiene la placa. Para ello, es importante poner las placas en posición inclinada y succionar el medio con la pipeta Pasteur desde una esquina, asegurándose de que no se tocan las células vivas que estarán adheridas a la base del pocillo. A continuación se añaden 2 mL de medio de diferenciación desde la misma esquina. Se cubren las placas y se introducen al incubador.

El medio de diferenciación es un medio de crecimiento suplementado con IBMX, dexametasona e insulina, compuestos proadipogénicos implicados en la activación de una cascada altamente coordinada y regulada de factores de transcripción que, en conjunto, conducen al establecimiento del estado diferenciado.

Este día de inducción de la diferenciación se considerará el día 0. A partir de este momento las células empezarán a diferenciarse y a madurar.

Maduración de adipocitos

El medio de adipocitos maduros se cambia una vez cada dos días. Es importante reseñar que el día 2, el medio de adipocitos maduros lleva una concentración de insulina equivalente a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de este día, en todos los cambios de medio que se realicen en el futuro, se añadirá un medio de adipocitos maduros que contiene 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina.

Para cualquier cambio de medio se repite el procedimiento descrito en el apartado anterior, teniendo en cuenta que el medio a añadir en cada uno de los días de maduración lleve la cantidad de insulina correspondiente a ese día.

Cuantificación de TG

La cuantificación de TG se realiza los días 2, 6 y 12 de diferenciación. Para ello, se destina al menos una placa de 6 pocillos para cada día. Cada uno de los días de diferenciación se realiza el mismo procedimiento para la determinación de TG.

Para llevar a cabo esta técnica es necesario preparar en la campana los siguientes reactivos y material de trabajo:

- Una pipeta Pasteur unida a la bomba de succión.
- PBS 1X.
- El succionador de pipetas y una pipeta de 10 mL.
- Disolución hexano/isopropanol (H/I) 2:1 (v/v). Esta solución ha de estar fría, por lo que conviene mantenerla en el congelador hasta el momento de su uso.

En primer lugar se retira el medio de cada uno de los pocillos mediante la pipeta Pasteur y la bomba de succión. A continuación se añade 1 mL de PBS 1X a cada uno de los pocillos para el lavado de células y se vuelve a retirar. Posteriormente, se cubre la placa y se pasa a trabajar en una campana de extracción de seguridad apropiada para el uso de solventes volátiles.

Se añaden 800 μL de la solución H/I a cada pocillo y se dispone la placa en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos para que se dé la extracción de los TG de las células. Al cabo de este tiempo se recogen los 800 μL de cada pocillo y se pasan a un tubo. Se vuelve a repetir esta operación 2 veces más de forma que al final se consiguen recolectar 2,4 mL de cada pocillo en cada uno de los tubos. En este momento, los tubos se pueden congelar a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta que se pueda llevar a cabo la cuantificación de TG extraídos de las células de los días 2, 6 y 12 de diferenciación.

Tras el día 12 de diferenciación se sacan todos los tubos del congelador y se evapora el H/I mediante N_2 gas o una centrífuga- evaporadora. Se diluye el "pellet" obtenido en 200 μL de Tritón X-100 al 1% en agua destilada. Se mezcla el contenido de cada tubo mediante un vórtex y se sonica durante 5 segundos.

Los TG presentes en cada tubo, que proceden de la grasa extraída de los adipocitos de distintos días de maduración, se cuantifican por espectrofotometría mediante kit comercial.

Una vez retirado el H/I de cada uno de los pocillos de cultivo celular, se esperan 5 min para asegurar que estos disolventes se hayan evaporado por completo. A continuación, se añaden en cada pocillo 800 μL de SDS/NaOH (0,1%/0,3 N) y se ponen en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. Con la adición de esta mezcla reactiva se consigue lisar la célula y, por tanto, extraer el contenido proteico de la misma.

Se recoge el volumen de cada uno de los pocillos y se cuantifica la proteína por espectrofotometría mediante kit comercial.

Cálculos

La cantidad de TG se determina a través de la medida de glicerol, los resultados obtenidos se expresan como mmoles de glicerol/mg de proteína.

BIBLIOGRAFÍA

- Gregoire FM. (2001). Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med* 226:997-1002.
- Rosen ED and MacDougald OA (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:885-896.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

			Adipocito maduro		
Día Estadio de maduración	Preadipocito sembrado	Preadipocito Confluencia	2	6	12
Análisis cualitativo: Describir la morfología celular					
Análisis cuantitativo: Determinar la cantidad de TG					
Comparación análisis					



COMENTARIOS

Aislamiento, manejo y estudios en mitocondrias hepáticas

P. Valdecantos Jiménez de Andrade y P. Pérez-Matute

INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias son los orgánulos celulares responsables de la mayoría de los procesos metabólicos celulares relacionados con la obtención y transformación de la energía. Así, su principal función es la de sintetizar ATP a través de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa en conexión con el ciclo de Krebs y el

catabolismo de los ácidos grasos por el proceso de la β -oxidación (Fig. P42-1).

El tamaño de estos orgánulos oscila entre 0,5 y 1 μm de diámetro y pueden presentar hasta 7 μm de longitud. Cada célula puede contener entre cientos y miles de mitocondrias. De hecho, el número de estos orgánulos varía en función de las necesidades energéticas de la célula. Las mitocondrias se encuentran rodeadas por un sistema

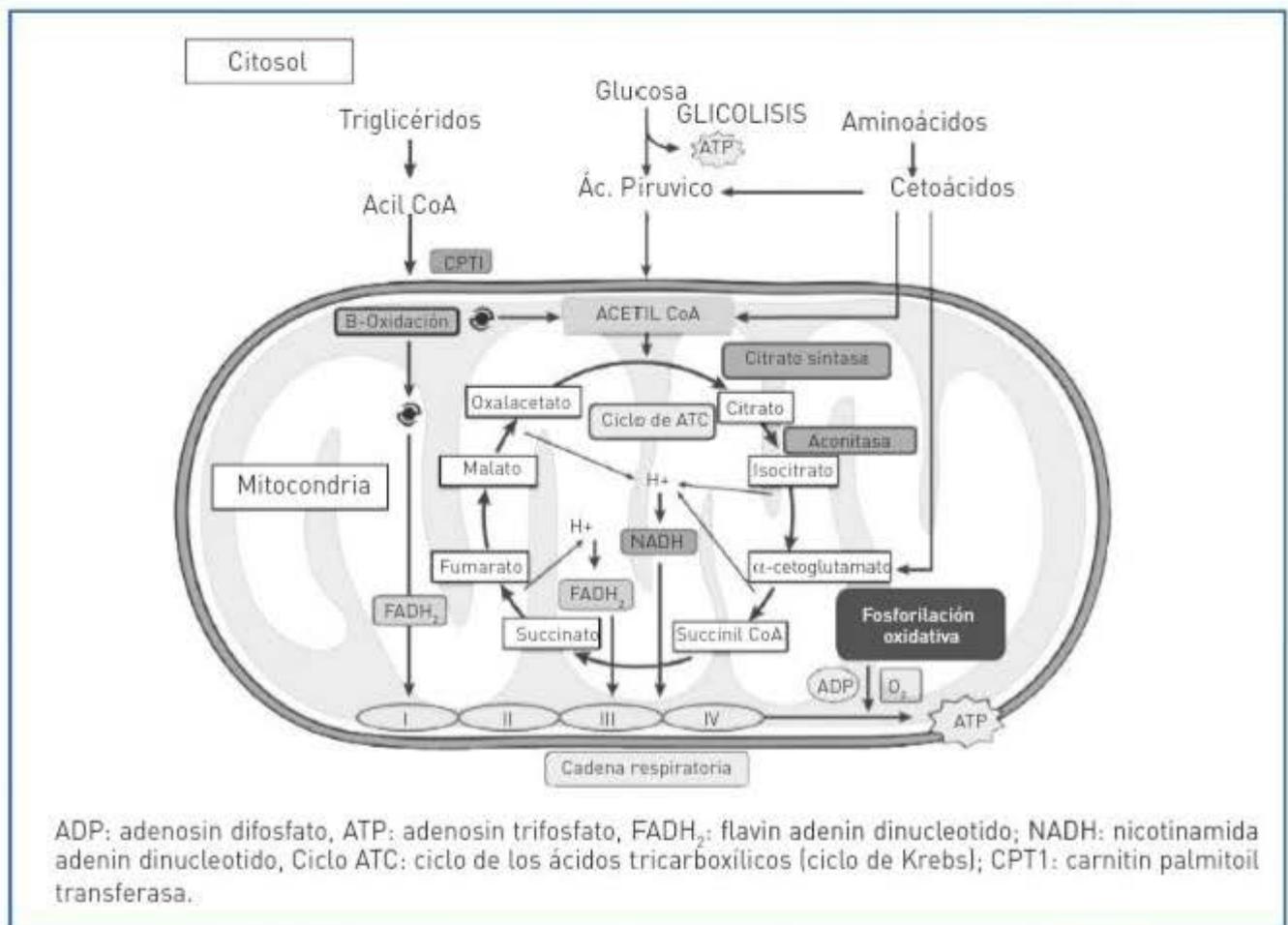


Figura P42-1. Metabolismo oxidativo mitocondrial. Adaptado de Rogge, M (2009).

de doble membrana, constituido por una membrana mitocondrial externa y otra interna separadas por un espacio intermembrana. En el interior de esta estructura de doble membrana se encuentra la matriz mitocondrial en la que se encuentran numerosas enzimas responsables de diferentes procesos metabólicos como el ciclo de Krebs o la β -oxidación así como el genoma mitocondrial.

Aunque durante años se ha considerado a estos orgánulos como “simples” fuentes de energía, hoy en día se ha demostrado su papel fundamental en diferentes procesos como la apoptosis y el mantenimiento del estado redox celular. De hecho, la mitocondria es la principal fuente de especies reactivas de oxígeno en el organismo, aunque también posee una serie de defensas antioxidantes que le permiten mantener un equilibrio, si bien es cierto que un fallo en el mantenimiento de dicho equilibrio redox puede dar lugar a un daño oxidativo al afectar a moléculas clave como el DNA, inducir oxidación lipídica, etc., y, que en consecuencia, puede desencadenar diversos procesos patológicos, entre los que cabe destacar la insulinoresistencia y la obesidad. De hecho, hoy en día se considera la mitocondria, y sobre todo el daño mitocondrial, el origen de muchas patologías con importantes implicaciones en la salud pública como la anteriormente citada obesidad, la diabetes, etcétera.

Por otro lado, el hígado siempre ha jugado un importante papel en la regulación del metabolismo y la afectación de la funcionalidad hepática se encuentra ligada a variadas patologías metabólicas. Recientemente, algunas investigaciones han descrito que las alteraciones que se producen en el compartimento hepático mitocondrial en situaciones de obesidad pueden preceder y contribuir al desarrollo posterior de insulinoresistencia y de otras enfermedades metabólicas.

OBJETIVO

Los objetivos a desarrollar en esta práctica serán, en primer lugar, aislar la fracción mitocondrial hepática por sedimentación diferencial, y a continuación, valorar la funcionalidad de las mitocondrias aisladas mediante la medición de los principales parámetros respiratorios: consumo de oxígeno en los diferentes estados respiratorios, ratio de control respiratorio (RCR) y ratio P:O (relación entre la síntesis de ATP y el consumo de oxígeno).

PROCEDIMIENTO

Fundamento

El aislamiento de mitocondrias que se describe a continuación puede ser aplicado con pequeñas modificaciones a las mitocondrias de cualquier tejido y no sólo a las hepáticas, que es el ejemplo que se muestra en esta práctica. En primer lugar, se procede a la ruptura de la membrana celular manteniendo las mitocondrias íntegras. Seguidamente, la fracción mitocondrial se aísla de otros orgánulos y restos celulares por centrifugación diferencial. Los extractos mitocondriales aislados tal y como se expone a continuación pueden ser congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y emplearse posteriormente para cuantificar, por ejemplo, la actividad de las principales defensas antioxidantes (enzimáticas y no enzimáticas) o para medir la producción de las principales especies reactivas oxígeno.

Igualmente, estas mitocondrias aisladas pueden ser tratadas *in vitro* con diferentes fármacos, antioxidantes, etc., con el objeto de estudiar los efectos directos de dichas sustancias sobre la funcionalidad mitocondrial, es decir, sobre el consumo de oxígeno en los diferentes estados respiratorios así como sobre los ratios RCR y P:O.

El método empleado para analizar que las mitocondrias aisladas con el protocolo que se describe a continuación son funcionales y se basa en la capacidad de un electrodo de oxígeno tipo Clark (Fig. P42-2) para detectar pequeñas y rápidas variaciones en la utilización del oxígeno, los cuales son determinados por cambios en la corriente eléctrica asociados al equilibrio electroquímico establecido entre el oxígeno disuelto en la muestra y el par ánodo-cátodo del electrodo (Fig. P42-2).

Mediante la medida del consumo de oxígeno se pueden analizar diferentes parámetros respiratorios que indican la funcionalidad e integridad mitocondrial. En función de los sustratos empleados para la medida del consumo de oxígeno se analizan los diferentes estados respiratorios (Fig. 42-3), que son:

- **Estado 2:** corresponde a un funcionamiento no fosforilativo de la cadena de transporte de electrones y está caracterizado por la presencia de un sustrato oxidable, como el succinato, así como por la ausencia de ADP y el consumo lento de oxígeno.

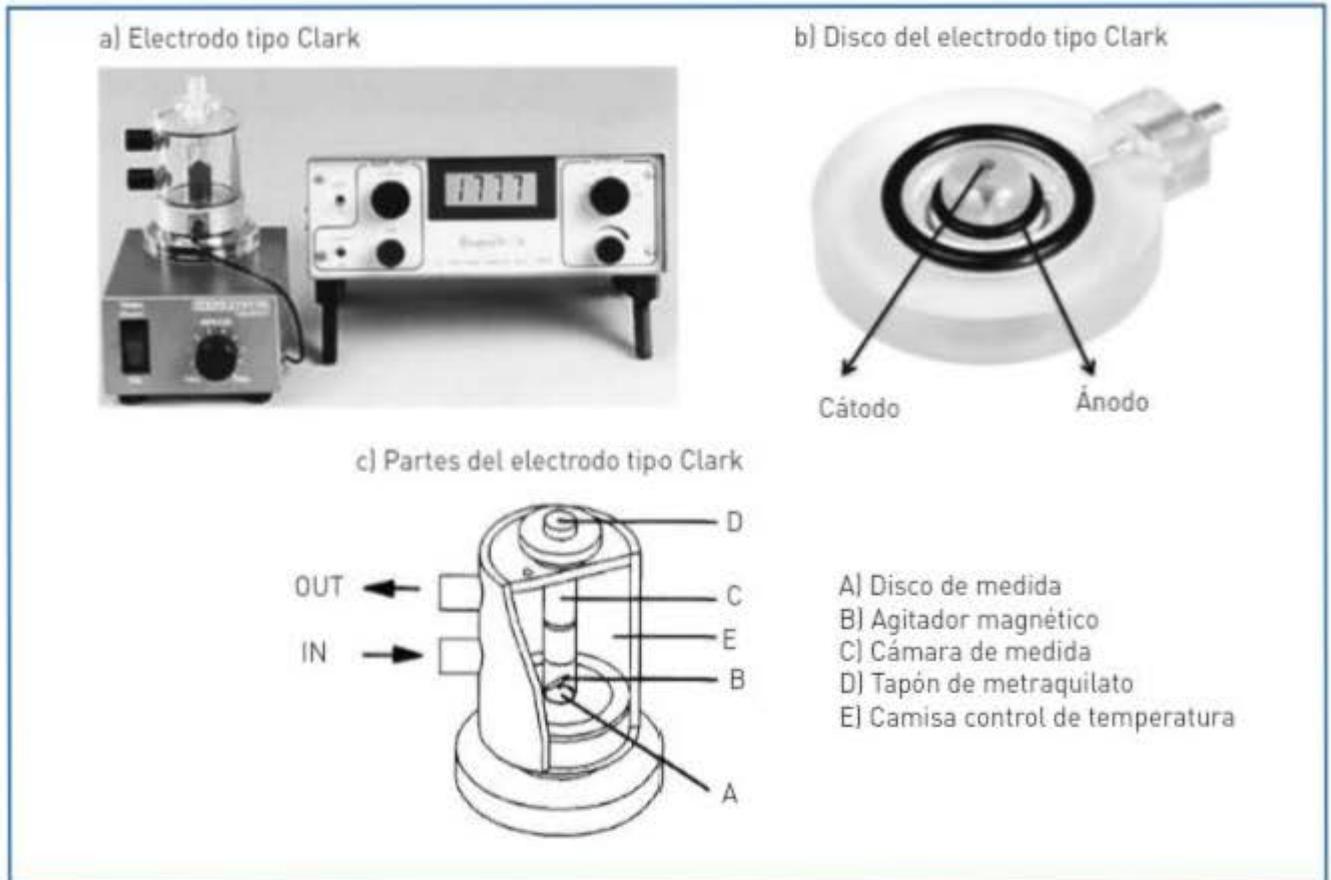


Figura P42-2. Imágenes del electrodo tipo Clark.

- Estado 3: corresponde a un funcionamiento oxidativo de la cadena de transporte y se establece tras la adición de ADP y está caracterizado por un elevado consumo de oxígeno.
- Estado 4: se establece cuando todo el ADP disponible es transformado en ATP y se restablece un estado no fosforilativo con un consumo de oxígeno lento.

Con los datos obtenidos en los estados respiratorios se pueden calcular diferentes ratios que son los marcadores/indicadores de la funcionalidad mitocondrial. Los dos principales son:

- **Ratio de control respiratorio (RCR):** se utiliza como marcador del acoplamiento entre la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP. Este ratio indica la integridad y funcionalidad mitocondrial. Se calcula como el cociente entre el consumo de oxígeno (nm/min) en el estado 3 y en el estado 4.
- **Ratio P:O:** una medida indirecta de la eficiencia de la fosforilación oxidativa, es decir, que calcula la relación entre la síntesis de ATP y el con-



Figura P42-3. Consumo de oxígeno en los diferentes estados respiratorios [gráfica obtenida en un oxígrafo].

sumo de oxígeno y que se calcula como el cociente entre el ADP y el oxígeno consumido en el estado 3.

Material y equipos

Equipos

- Homogeneizador Potter-Elvehjem.
- Tubo de vidrio y pistilo para homogeneizador Potter-Elvehjem.
- Centrifuga y rotores (y adaptadores para el rotor si fuera necesario).
- Electrodo de oxígeno tipo Clark y caja de control.
- Registrador.
- Microjeringas (Microliter™ Syringe).
- Baño termostático a 30 °C.
- Bomba de vacío.
- Filtros de 50 µm de diámetro del poro.

Reactivos

- Sacarosa de un 99% de pureza.
- Resina de intercambio iónico.
- TES al 99%.
- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).
- Albúmina sérica bovina (BSA 99%), libre de ácidos grasos y globulinas.
- D-manitol.
- H_2PO_4
- $MgCl_2$.
- Hepes de un 99,5% de pureza..
- Rotenona.
- Succinato.
- Adenosin difosfato (ADP).
- Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP).
- Agua ultrapura.

Protocolo

Preparación de soluciones

Solución de sacarosa desionizada (1,25 M)

- Sacarosa de pureza 99%.
- Añadir resina de intercambio iónico (0,5 g/25 mL solución).

- Dejarlo 24 horas a 4 °C con agitación.
- Filtrar en filtro de 50 µm.

Medio 1 (pH 7,4)

- Sacarosa desionizada 250 mM.
- NaTes (pH 7,4) 5 mM.
- EDTA 1 mM.
- Agua milli Q.

Medio 2 (pH 7,4)

- Sacarosa desionizada 250 mM.
- NaTes (pH 7,4) 5 mM.
- BSA 99% FFA 5 mg/mL.
- Agua milli Q.

Medio 3 (pH 7,8)

- Sacarosa desionizada 70 mM.
- Manitol 250 mM.
- KH_2PO_4 2,5 mM.
- $MgCl_2$ 2,5 mM.
- EDTA 0,5 mM.
- Hepes 2 mM.
- BSA FFA (99 %) 0,1% (p:v).
- Agua milli Q.

Extracción de las mitocondrias

Inmediatamente después de la extracción del hígado, se introduce en el medio 1 (10 mL/g tejido) mantenido en hielo y se fragmenta con tijeras. A continuación se homogeneiza en un homogeneizador Potter-Elvehjem (6/8 ciclos de 10 segundos). El homogeneizado resultante se centrifuga a 3.000 g durante 10 min a 4 °C (paso 1 del esquema que se incluye a continuación como figura P42-4). El sedimento constituido por núcleos y restos celulares se desecha. Con el sobrenadante se realiza una centrifugación a 9.000 g durante 10 min a 4 °C (paso 2) y se desecha el sobrenadante. El nuevo sedimento está formado por las mitocondrias pero pueden quedar restos de otros orgánulos. Para proceder a la purificación del sedimento mitocondrial se resuspende con pipeta en el medio 2 (2/5 del volumen inicial) y se repiten los pasos 1 y 2 obteniendo finalmente un precipitado purifica-

do que está constituido por la fracción mitocondrial ya limpia. Este último precipitado se resuspende con pipeta en medio 2 (0,5 mL/g de tejido inicial). Todas las operaciones descritas en el transcurso del aislamiento se realizarán a 4 °C (hielo) y con material libre de jabones (Fig. P42-4).

Análisis de la funcionalidad mitocondrial

Antes de comenzar la medida es necesaria la calibración del electrodo así como un período de estabilización de la señal. Para ello se pipetea 2 mL de agua ultrapura en la cámara del electrodo a la que se añaden unos cristales de ditionito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Esto provoca que la concentración de O_2 descienda rápidamente a cero. En ese momento se ajusta el valor del registrador y del dispositivo de control a cero, correspondiente a la ausencia de corriente eléctrica. Seguidamente, se

aspira esta solución con una bomba de vacío y, tras minuciosos lavados de la cámara con agua milli 1, se pipetea 2 mL de agua saturada de oxígeno a 30 °C. El valor estable que se registra en milivoltios equivale a 256 nm O_2/mL .

Una vez estabilizada la medida se pipetea en la cámara del electrodo 1 mL de medio 3 y se espera hasta que se estabilice la medida y se llegue a un equilibrio de gases con la atmósfera. Después se añade la suspensión de mitocondrias que sea equivalente a una concentración de proteína de 1 mg/mL. A continuación, se cierra la cámara y se espera a la estabilización de la señal. Por último, se añaden diversos sustratos, con microjeringas a través del orificio del tapón, para establecer los estados respiratorios en la siguiente secuencia:

- Rotenona 5 μM \Rightarrow Inhibe el complejo I de la cadena de transporte.
- Succinato 2,5 mM \Rightarrow Establece el estado 2.

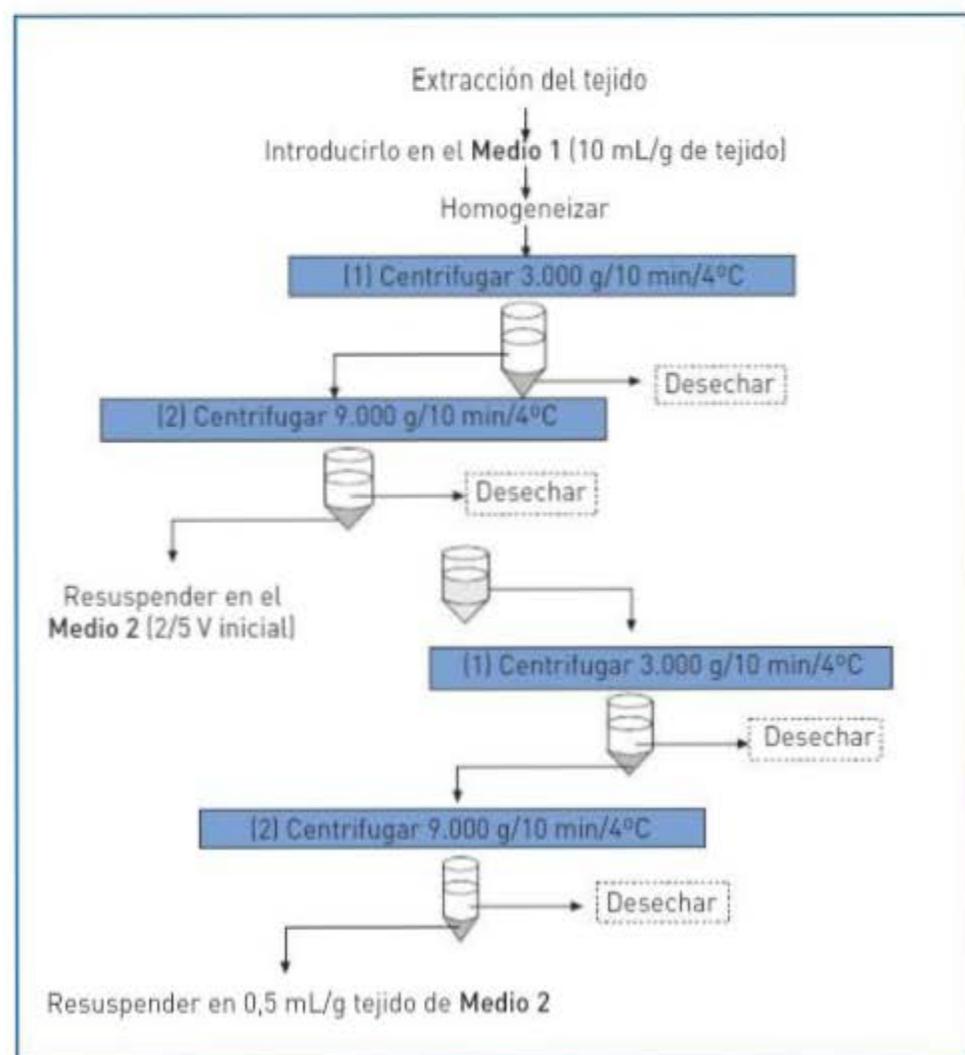


Figura P42-4. Esquema de la extracción de mitocondrias de hígado de rata.

- ADP 0,1 mM \Rightarrow Establece el estado 3 \Rightarrow Cuando se frena el consumo de oxígeno se establece el estado 4.
- ADP 0,2 mM \Rightarrow Restablecimiento del estado 3.
- CCCP 1 μ M \Rightarrow Induce el desacoplamiento de la cadena de electrones y la tasa máxima de consumo de oxígeno.

BIBLIOGRAFÍA

Eastbrook R (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods in enzymology* 10:41-7.

Hinkle PC (2005). P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1706 (1-2):1-11.

Rogge MM (2009). The role of impaired mitochondrial lipid oxidation in obesity. *Biological research for nursing* 10 (4):356-73.

Raffaella C, Francesca B, Italia F, Marina P, Giovanna L, Susanna I (2008). Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance. *Obesity* 16 (5):958-64.

Valdecantos MP, Pérez-Matute P, Quintero P, Martínez JA (2010). Vitamin C, resveratrol and lipoic acid actions on isolated rat liver mitochondria: all antioxidants but different. *Redox Report* 15 (5): 207-216.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Modelo 1. Rendimiento de la extracción mitocondrial hepática

Código	Fecha	Peso animal	Peso hígado	Peso muestra	Concentración (μ prot)	Incidencias

Modelo 2. Datos de la funcionalidad mitocondrial: parámetros respiratorios

			Estado 3					
Código	Fecha	Estado 2 (nm/min)	(nm/min)	mm O	Estado 4 (nm/min)	RCR	P:O	Incidencias

COMENTARIOS



Aplicaciones de los isótopos estables en la nutrición y en el diagnóstico clínico

A. Díaz-Lagares y A. B. Crujeiras Martínez

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de técnicas de marcaje con isótopos estables ha permitido la realización de pruebas diagnósticas y el estudio de estrategias terapéuticas *in vivo* de manera inocua para detectar alteraciones metabólicas. Los isótopos estables son átomos no radiactivos del mismo elemento químico, el cual difiere únicamente en su número de neutrones. Estos elementos existen de manera natural como el ^2H , ^{15}N , ^{18}O y en particular el ^{13}C , los cuales constituyen trazadores útiles para estudios de metabolismo.

El isótopo estable más utilizado y el que ofrece mayores ventajas es el ^{13}C . Los compuestos marcados con ^{13}C son ingeridos y tras la digestión y absorción, son metabolizados y oxidados dando lugar a H_2O , $^{13}\text{CO}_2$ y $^{12}\text{CO}_2$. Esta prueba se denomina test en aliento y constituye un método no invasivo que puede ser empleado en la nutrición y el diagnóstico clínico (Tabla P43-1).

OBJETIVO

Los objetivos de la presente práctica son dos. En primer lugar, se pretende evaluar la función mitocondrial *in vivo* mediante la determinación de los parámetros de oxidación obtenidos a partir del test en aliento con 2-ceto[1- ^{13}C]isocaproato. El segundo objetivo consistirá en estudiar la función pancreática exocrina *in vivo* mediante la determinación de la actividad de la enzima lipasa pancreática empleando el test en aliento con triglicéridos mixtos marcados con ^{13}C .

PROCEDIMIENTO

Los test en aliento con ^{13}C se basan en la cuantificación de las proporciones de dos isótopos no radiactivos del átomo de carbono en la forma de CO_2 : el carbono 12 (^{12}C) y el carbono 13 (^{13}C).

Tabla P43-1. EJEMPLOS DE TEST EN ALIMENTO CON ISÓTOPOS ESTABLES

Test en aliento	Aplicación clínica
^{13}C urea	Infecciones por <i>Helicobacter pylori</i>
Agua doblemente marcada ($^2\text{H}_2\text{O}$ y H_2^{18}O)	Contenido total de agua corporal y gasto energético total
Ácido ^{13}C -octanoico	Velocidad de vaciamiento gástrico
^{13}C -triglicéridos mixtos	Función pancreática exocrina
[1- ^{13}C]leucina, [^{13}C]glicerol, palmitico o fenitalanina, [^{13}C]glucosa	Metabolismo de macronutrientes
2-ceto[1- ^{13}C]isocaproato (KICA)	Oxidación mitocondrial

Estos dos isótopos existen de manera natural en el aliento normal pero presentan diferentes proporciones. Del CO_2 exhalado, aproximadamente el 99% es ^{12}C y el 1% es ^{13}C . Mediante estos ensayos en aliento se detecta el cambio de esta proporción tras la administración a los pacientes de una comida o bebida prueba que contiene un sustrato marcado con ^{13}C . Este trazador será metabolizado hasta la producción de $^{13}\text{CO}_2$, el cual será exhalado con el total del CO_2 producido por el organismo (Fig. P43-1).

La detección de la aparición de un isótopo estable en aliento se lleva a cabo mediante la técnica de espectrometría de masas de relación isotópica (IRMS), la cual permite analizar el CO_2 del aire espirado. Se obtienen así unos valores que corresponden con la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en el aliento. A continuación, el enriquecimiento de ^{13}C en la muestra de aliento (Ecuación 1) se expresa como δ^{13} (delta 13 , ‰). Este parámetro representa el tanto por mil de átomos del trazador presente en la muestra de aliento con respecto a un estándar internacional correspondiente al contenido de ^{13}C en una piedra caliza (*Pee Dee Belemnite*, PDB).

Ecuación 1:

$$\delta^{13} (\text{‰}) = (R_{\text{sa}}/R_{\text{st}} - 1) \times 1.000$$

donde R_{sa} representa la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en la muestra de aliento y R_{st} (0,0112372) indica la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en el estándar PDB.

A partir de los datos de δ^{13} se obtiene el parámetro DOB_i (*Delta Over Baseline*; Ecuación 2) que representa el valor de δ^{13} en cada momento (δ^{13}_i) con respecto al valor basal (δ^{13}_0).

Ecuación 2:

$$\text{DOB}_i = \delta^{13}_i - \delta^{13}_0$$

Posteriormente, se obtiene la fracción de ^{13}C que es eliminada en el aliento en un momento determinado (Ecuación 3) mediante el cálculo del porcentaje de dosis administrada de ^{13}C recuperada en el aliento por unidad de tiempo (% dosis/h).

Ecuación 3:

$$\% \text{ dosis/h}_i = 100 \times (\text{DOB}_i / 1.000 \times R_{\text{st}} \times \text{CO}_{2 \text{ producido}}) / \text{dosis}$$

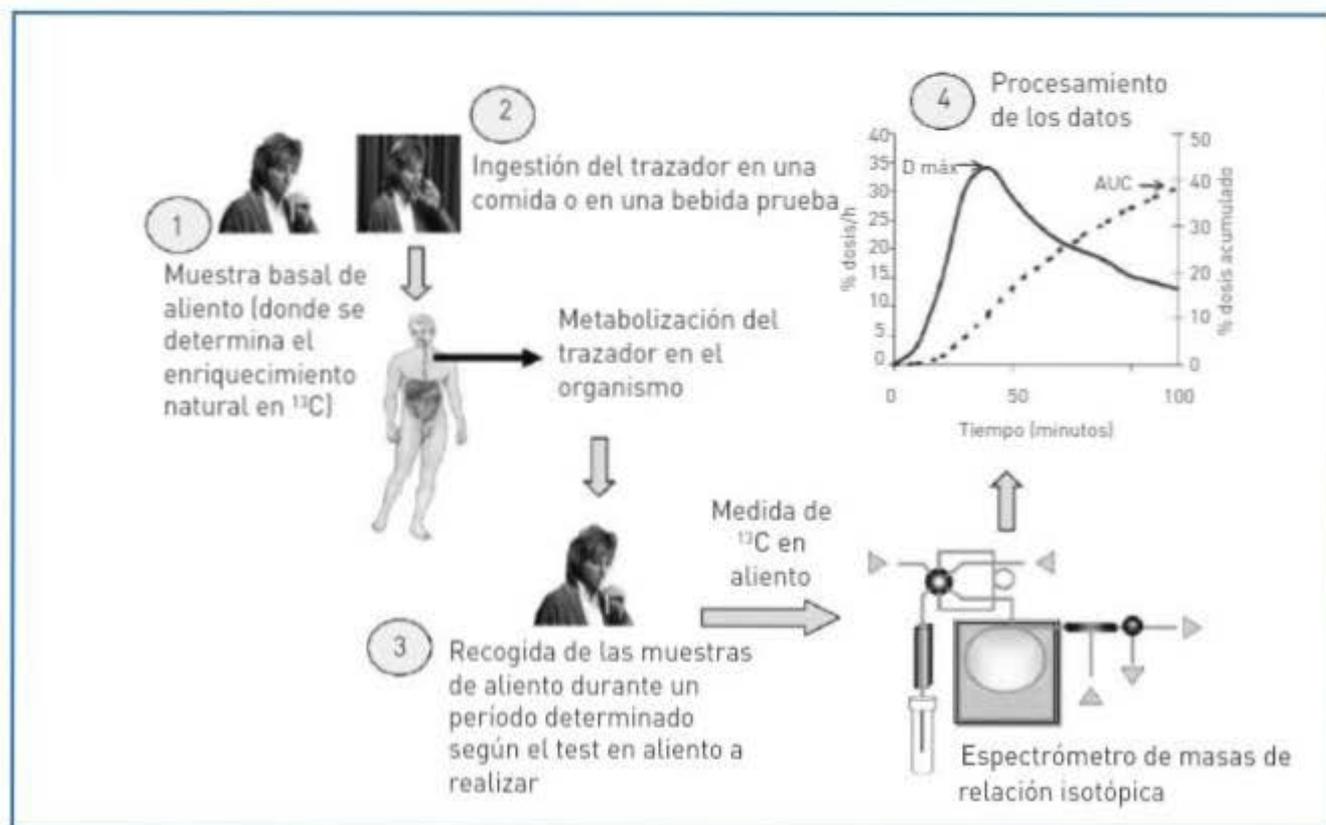


Figura P43-1. Fundamento general de los test en aliento con ^{13}C (Modificado de Parra y Martínez, 2006).

donde el CO_2 producido representa el CO_2 espirado total en mmol/h y la dosis indica la cantidad de sustrato en miligramos que se administra.

El CO_2 producido proviene de la multiplicación de $300 \text{ mmol/m}^2/\text{h}$ (producción endógena de CO_2) por el área de superficie corporal (ASC) calculada según la fórmula de Haycock: $\text{ASC} = (\text{peso en kg})^{0,5378} \times (\text{altura en cm})^{0,7246} \times 0,024265$. Por otra parte, la dosis se obtiene teniendo en cuenta la cantidad de sustrato administrado (mg), el peso molecular del sustrato (PM; g/mol), la riqueza en ^{13}C del sustrato (P) y el número de átomos marcados con ^{13}C en cada molécula de trazador (n):

$$\text{Dosis} = (\text{mg/PM}) \times (P \times n/100)$$

A continuación, mediante el método trapezoidal (Ecuación 4) se calcula la fracción de ^{13}C eliminada en el aliento dentro de cada período de tiempo (% dosis).

Ecuación 4:

$$\% \text{ dosis}_{i+(i+1)} = (0,5 \times (\text{DOB}_i + \text{DOB}_{i+1}) / 1.000 \times \Delta t \times \text{Rst} \times \text{CO}_2 \text{ producido} / \text{dosis}) \times 100$$

donde Δt representa el tiempo entre dos tomas de muestra expresado en horas.

Finalmente, mediante la suma acumulada del % de dosis se calcula el % de dosis acumulado de ^{13}C que se elimina en el aliento. De este modo, se obtiene el valor del área bajo la curva (AUC) que representa el porcentaje de la dosis de ^{13}C administrada que se elimina en el aliento tras el tiempo que dura el ensayo.

PRÁCTICA 1: EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL MEDIANTE EL TEST EN ALIENTO CON 2-CETO[1- ^{13}C]ISOCAPROATO

Fundamento

El test en aliento con 2-ceto[1- ^{13}C]isocaproato (KICA) se basa en la medida del enriquecimiento en aliento de ^{13}C sobre los niveles basales después de la administración de una bebida prueba que contiene el ácido 2-cetoisocaproato marcado con ^{13}C en el grupo carboxílico (Fig. P43-2). Este

sustrato es descarboxilado en la mitocondria por el complejo deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada. El $^{13}\text{CO}_2$ que se obtiene en dicha descarboxilación es exhalado en el aliento de manera que el enriquecimiento del aliento en ^{13}C es una medida indirecta de la función mitocondrial.

Material y equipos

- Balanza de precisión.
- Báscula y tallímetro.
- Espectrómetro de masas de relación isotópica.
- Tubos de vidrio de 12 mL con tapón de rosca para la recogida de muestras de aliento.
- Pajitas.
- Zumo de naranja comercial.
- Sal de 2-ceto[1- ^{13}C]isocaproato de sodio.
- L-leucina.
- Vasos de plástico.

Protocolo

Preparación de la bebida prueba

La bebida prueba se prepara disolviendo 1 mg/kg de peso corporal del trazador 2-ceto[1- ^{13}C]isocaproato de sodio junto con 20 mg/kg de peso corporal de L-leucina en 200 mL de zumo de naranja comercial en un vaso de plástico.

Recogida de las muestras de aliento

Tras una noche de ayuno, los voluntarios deben estar en reposo durante los 15 minutos previos y durante todo el desarrollo de la prueba. Se recogerá una muestra basal de aliento y posteriormente otra muestra cada 10 minutos después de la ingestión del zumo prueba durante un período de tiempo de 120 minutos. La recogida de las muestras se realizará mediante la exhalación de aire de forma lenta y completa por medio de una pajita en un tubo de vidrio especializado. Una vez realizada la espiración, la pajita debe retirarse del tubo, el cual debe de taparse inmediatamente.

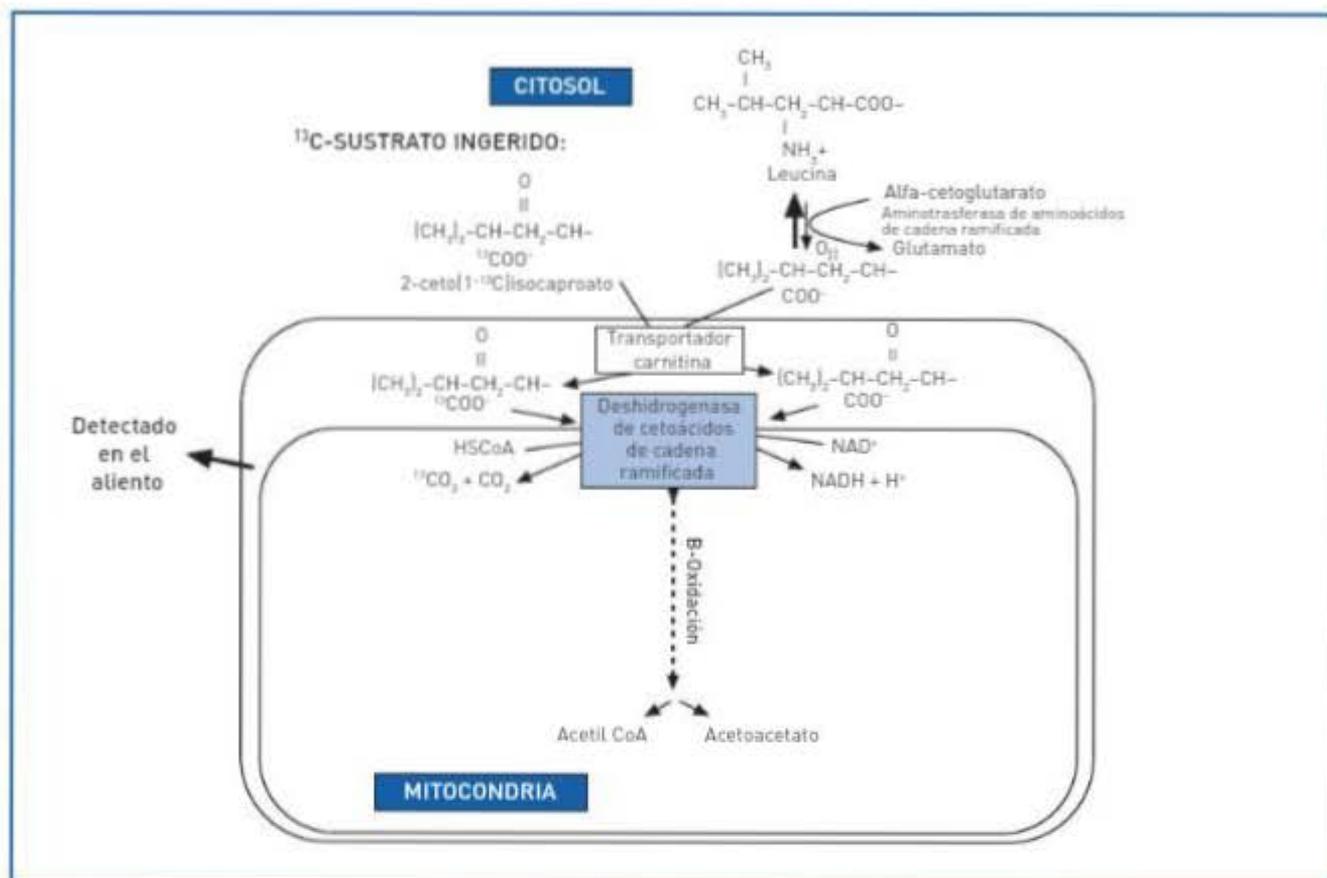


Figura P43-2. Actividad del complejo mitocondrial de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada evaluada mediante el KICA (modificado de Parra y Martínez, 2006).

Cálculos

El enriquecimiento en ^{13}C de las muestras de aliento se determina empleando espectrometría de masas de relación isotópica. Los resultados obtenidos mediante esta técnica se expresan mediante el valor δ^{13} (‰). Este valor se convierte en el porcentaje de ^{13}C administrado que se recoge en el aliento en la unidad de tiempo (% dosis/h). La curva que representa la evolución temporal de estos datos transformados se analiza con el fin de obtener los parámetros característicos que describen el proceso de oxidación:

- **Porcentaje de trazador oxidado o área bajo la curva (AUC, %):** es la recuperación acumulada del trazador calculada por un período de tiempo dentro del rango de 0-120 min.
- **Velocidad máxima de oxidación (Dmax, % dosis/h).**
- **Constante de velocidad (τ , minutos $^{-1}$):** pendiente de la última porción lineal de la curva que describe la evolución temporal de la tasa de oxidación mitocondrial del trazador 2-ceto[1- ^{13}C]isocaproato.

PRÁCTICA 2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA LIPASA PANCREÁTICA MEDIANTE EL TEST EN ALIENTO CON ^{13}C -TRIGLICÉRIDOS MIXTOS

Fundamento

El test en aliento con triglicéridos mixtos marcados con ^{13}C se basa en la ingestión por parte del paciente de una comida prueba marcada con triglicéridos mixtos (ác. 1,3-diestearil [^{13}C -octanoil] glicerol) con ^{13}C (Fig. P43-3). Tras la ingestión del trazador, la lipasa pancreática digiere los triglicéridos marcados con ^{13}C en el lumen intestinal obteniéndose el ^{13}C -ácido octanoico, el cual es rápidamente absorbido por el intestino y posteriormente oxidado en el hígado. Como consecuencia de esta metabolización se produce $^{13}\text{CO}_2$, de modo que el ^{13}C puede ser detectado en el aliento.

Material y equipos

- Balanza de precisión.
- Báscula y tallímetro.

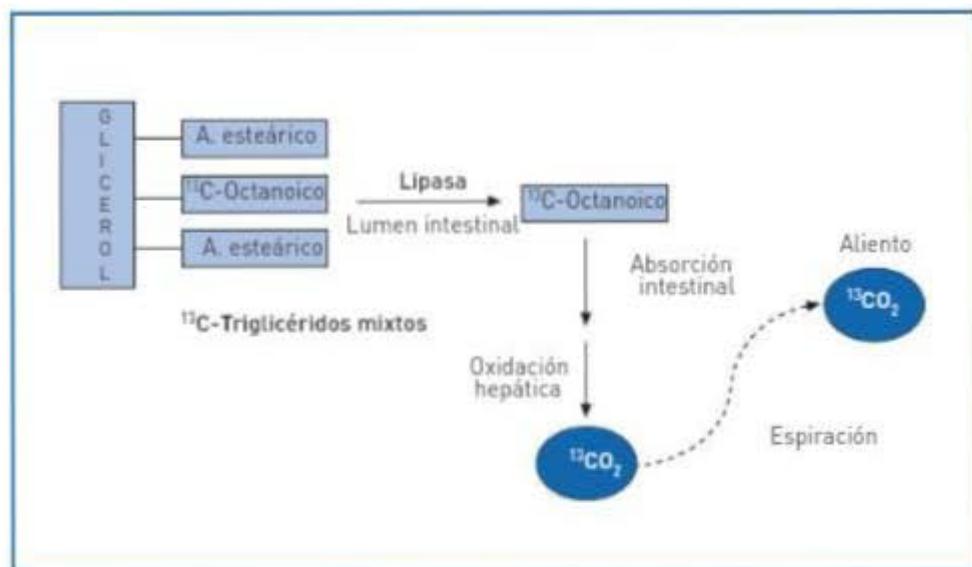


Figura P43-3. Metabolización de los ^{13}C -triglicéridos mixtos por la lipasa pancreática.

- Espectrómetro de masas de relación isotópica.
- Tubos de vidrio de 12 mL con tapón de rosca para la recogida de muestras de aliento.
- Pajitas.
- Mantequilla y pan de molde.
- Zumo de naranja comercial.
- Triglicéridos mixtos marcados con ^{13}C .
- Recipiente de vidrio.
- Vasos de plástico.

Protocolo

Preparación de la comida prueba

Se prepara la comida prueba mezclando en un recipiente de vidrio 200 mg de ^{13}C -triglicéridos mixtos con 25 g de mantequilla. A continuación, se untan 2 rebanadas de pan de molde con la mezcla obtenida.

Recogida de las muestras de aliento

Las muestras de aliento se tomarán con el voluntario en reposo después de haber permanecido en ayunas durante toda la noche. En primer lugar, se recoge una muestra basal de aliento de manera que los voluntarios deben realizar una inspiración y expulsar el aire de forma lenta y completa por medio de una pajita en un tubo de vidrio. A medida que se realiza la espiración la pajita debe retirarse del tubo que se tapaná inmediatamente. Posteriormente, se administra a los voluntarios la comida prueba acompañada de 200 mL de zumo de naranja, el cual debe consumirse en menos de

10 minutos. Seguidamente hay que recoger cada 15 minutos durante 6 horas una muestra de aliento en tubos de vidrio de forma similar al procedimiento realizado en condiciones basales.

Cálculos

Determinación de la actividad de la lipasa pancreática

Mediante espectrometría de masas de relación isotópica se obtiene el enriquecimiento en ^{13}C de las muestras de aliento expresado como δ^{13} (‰). A partir de este valor se calcula la fracción de ^{13}C que es eliminada en el aliento por unidad de tiempo (% dosis/h) y la fracción acumulada de ^{13}C eliminada en el aliento (% dosis acumulado). Finalmente, se obtiene el AUC con el fin de valorar la actividad de la lipasa pancreática. Esta actividad enzimática puede considerarse normal cuando el AUC es superior al 22%, aunque hay que tener en cuenta que este valor de referencia puede variar según la metodología empleada.

BIBLIOGRAFÍA

- Bodamer OAF, Halliday D (2001). Uses of stable isotopes in clinical diagnosis and research in the paediatric population. *Arch Dis Child* 84:444-448.
- Crujeiras AB, Parra D, Goyenechea E, Abete I, González-Muniesa P, Martínez JA (2008). Energy restric-

tion in obese subjects impact differently two mitochondrial function markers. *J Physiol Biochem* 64:211-9.

Jonderko K, Du Z, Szymshal M, Kasicka-Jonderko A, BBoDska-Fajfrowska B (2009). Normative values

for the ¹³C-mixed triglyceride breath test in two age groups. *Med Sci Monit* 15:CR255-9.

Parra MD, Martínez JA (2006). Nutritional aspects of breath testing based on stable isotopes. *Nutr Rev* 64:338-347.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Práctica 1. Evaluación de la función mitocondrial mediante el test en aliento con 2-ceto[1-¹³C]isocaproato

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la realización del test en aliento con 2-ceto[1-¹³C]isocaproato a un varón de 42 años con sobrepeso que siguió un tratamiento de restricción calórica de la dieta para perder peso. Tras la realización de esta prueba se obtuvieron los datos de δ^{13} (‰), % dosis/h y % dosis acumulado antes y después del tratamiento (Fig. P43-4). A partir de estos datos dibujar la curva que representa la evolución temporal de los datos transformados representando en el eje de abscisas el tiempo (min) y en el eje de ordenadas el % dosis/h y el % dosis acumulado y obtener los parámetros de oxidación mitocondrial antes y después del tratamiento.

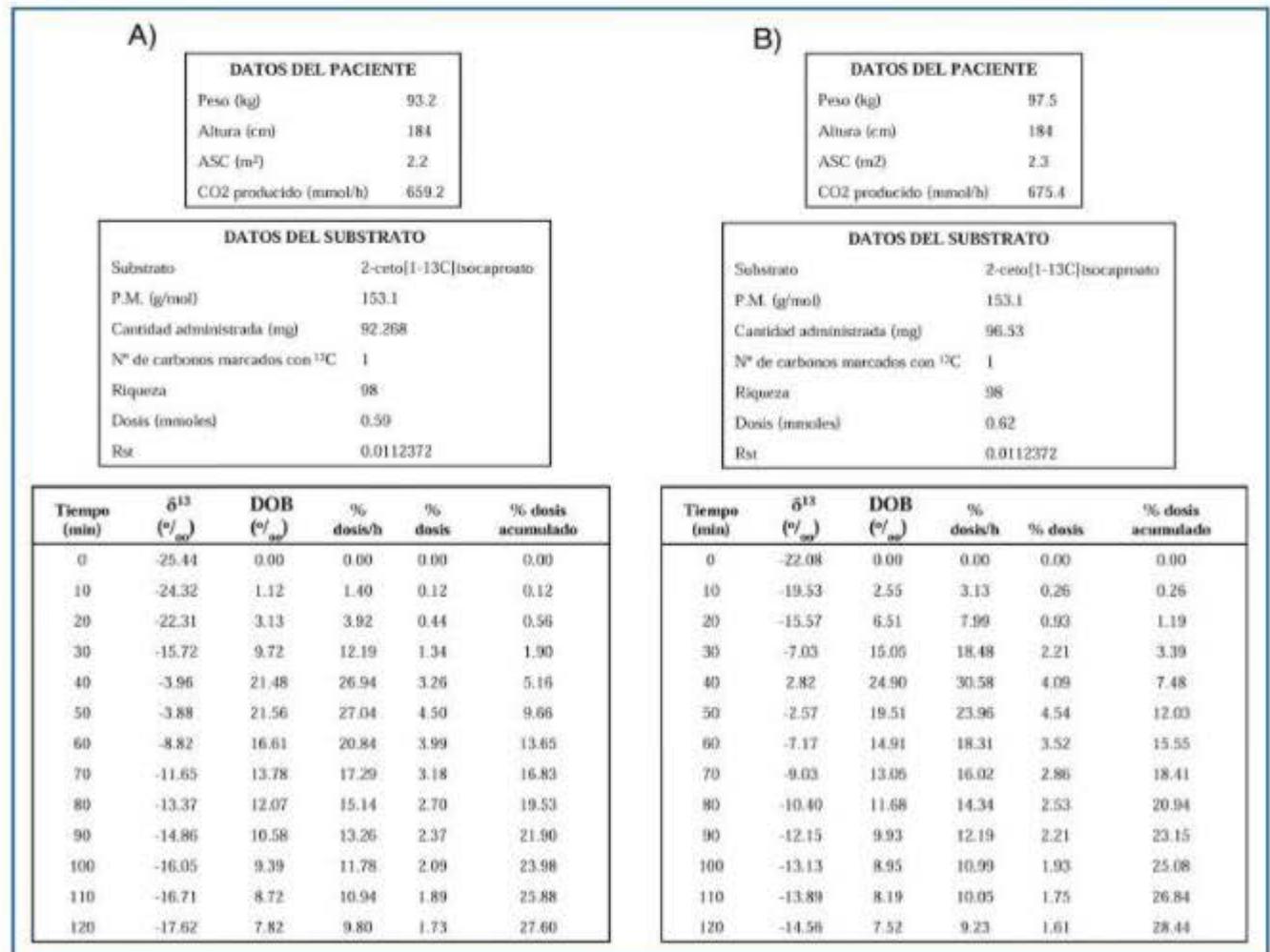


Figura P43-4. Resultados obtenidos mediante el test en aliento con 2-ceto[1-¹³C]isocaproato antes (A) y después (B) de la restricción calórica.

Práctica 2. Determinación de la actividad de la lipasa pancreática mediante el test en aliento con ^{13}C -triglicéridos mixtos

En un paciente diagnosticado de fibrosis quística se evaluó la existencia de una alteración en la función exocrina del páncreas mediante la determinación de la actividad de la lipasa pancreática con el test en aliento con ^{13}C -triglicéridos mixtos. Tras la realización de esta prueba se obtuvieron los datos de δ^{13} (‰), % dosis/h y % dosis acumulado (Fig. P43-5). A partir de estos datos se representará gráficamente el % dosis/h y el % dosis acumulado con respecto al tiempo (min). Posteriormente, se identificará el porcentaje de dosis acumulado de ^{13}C que se elimina en el aliento después de las 6 horas de duración de la prueba (AUC) y se interpretará el estado de la función exocrina del páncreas.

DATOS DEL PACIENTE		DATOS DEL SUBSTRATO				
Peso (kg)	85	Substrato	^{13}C -triglicéridos mixtos			
Altura (cm)	172	P.M. (g/mol)	752			
ASC (m ²)	2.04	Cantidad administrada (mg)	200			
CO ₂ producido (mmol/h)	610.81	Nº de carbonos marcados con ^{13}C	1			
		Riqueza	99			
		Dosis (nmoles)	0.26			
		Rat	0.0112372			

Tiempo (min)	δ^{13} (‰)	DOB (‰)	% dosis/h	% dosis	% dosis acumulado
0	-22.35	0.00	0.00	0.00	0.00
15	-22.37	-0.02	-0.05	-0.01	-0.01
30	-22.31	0.04	0.10	0.01	0.00
45	-22.51	-0.16	-0.42	-0.04	-0.04
60	-22.19	0.16	0.42	0.00	-0.04
75	-22.38	-0.03	-0.08	0.04	0.00
90	-21.77	0.58	1.51	0.18	0.18
105	-22.50	-0.15	-0.39	0.14	0.32
120	-21.57	0.78	2.03	0.21	0.53
135	-21.80	0.55	1.43	0.43	0.96
150	-21.31	1.04	2.71	0.52	1.48
165	-21.66	0.69	1.80	0.56	2.04
180	-21.35	1.00	2.61	0.55	2.59
195	-21.18	1.17	3.05	0.71	3.30
210	-21.17	1.18	3.08	0.77	4.07
225	-20.96	1.39	3.62	0.84	4.90
240	-20.50	1.85	4.82	1.06	5.96
255	-19.10	3.25	8.47	1.66	7.62
270	-20.11	2.24	5.84	1.79	9.41
285	-19.03	3.32	8.65	1.81	11.22
300	-18.89	3.46	9.02	2.21	13.43
315	-19.50	2.85	7.43	2.06	15.49
330	-20.11	2.24	5.84	1.66	17.15
345	-20.74	1.61	4.20	1.25	18.40
360	-20.49	1.86	4.85	1.13	19.53

Figura P43-5. Resultados obtenidos mediante el test en aliento con ^{13}C -triglicéridos mixtos en un paciente con sospecha de alteración exocrina del páncreas.



COMENTARIOS

A large, empty light blue rectangular area intended for writing comments.

Proteómica: técnicas de electroforesis y Western-Blot

V. M. Rodríguez Rivera y J. Miranda Gómez

INTRODUCCIÓN

La Proteómica se define como el estudio que permite identificar, clasificar y cuantificar las proteínas con respecto a su función. Por tanto, las técnicas que la abordan, sirvan como ejemplo las técnicas de electroforesis y Western-Blot, caracterizan las redes funcionales que establecen las proteínas y su dinámica durante procesos fisiológicos y patológicos. Este conjunto de técnicas poseen un amplio potencial de aplicación, dado que su uso en la actualidad abarca desde la identificación de nuevos marcadores para el diagnóstico de enfermedades, la identificación de nuevos fármacos, la determinación de proteínas involucradas en la patogenia de enfermedades, hasta el análisis de procesos de transducción de señales.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es familiarizarse con la técnica de Western-Blot, mediante la detección y cuantificación de la proteína desacoplante UCP-1.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

La técnica del Western-Blot nos permite la separación de las proteínas según su peso molecular por electroforesis en gel (Western), su inmovilización en una membrana (Blot), su posterior identificación mediante anticuerpos específicos y la obtención de una imagen fotográfica de las pro-

teínas objeto de análisis. El reconocimiento específico debido a fuerte afinidad de unión entre el antígeno (proteína inmovilizada) y el anticuerpo es la base de la técnica. La proteína a estudio es localizada por un anticuerpo primario específico que se une a ella. Después, un anticuerpo secundario especie-específico (cuyo antígeno es el anticuerpo primario) se une al complejo anticuerpo primario-proteína objeto. El anticuerpo secundario contiene la marca (generalmente peroxidasa de rábano) que con el reactivo adecuado producirá una luz que generará una imagen en papel fotográfico.

El análisis de los resultados se basa en la visualización de una o varias bandas que evidencian la presencia de la proteína a estudio. Igualmente, la intensidad de las bandas nos da una idea de la cantidad relativa de proteína expresada.

La proteína elegida para la realización del presente experimento es la proteína UCP-1. La proteína desacoplante UCP-1 o termogenina se expresa casi exclusivamente en tejido adiposo marrón, presente principalmente en mamíferos de pequeño tamaño (roedores), donde juega un importante papel en la termogénesis adaptativa. UCP-1 desacopla la respiración de la fosforilación oxidativa disipando el gradiente de protones generado por el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria.

Material y equipos

Muestras biológicas

- 100 mg de tejido adiposo marrón interescapular de rata o ratón.

Equipos

- Homogeneizador Potter.
- Centrifuga.
- Sistema de densitometría óptica.
- Balanza precisión.
- Centrifuga.
- Termobloque.

Material

- Eppendorf 1 o 0,5 mL.
- Hielo.
- Membranas de PVDF (fluoruro de polivilideno)¹.
- Casetes de revelado.
- Cubeta vertical de electroforesis
- Papel fotográfico.
- Film transparente.
- Cubetas o tarrinas de plástico².
- Film fotográfico.
- Tijeras y pinzas.
- Papel Wathman 3 MM.
- Caja de poliespan.
- Micropipetas y puntas de pipeta.

¹ Opcionalmente de nitrocelulosa.

² Del tamaño de una tarrina de mantequilla.

Reactivos

- PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro)³.
- NaCl.
- NaH₂PO₄.
- Disolución stock de acrilamida 30% y bis-acrilamida 0,8%.
- Glicerol.
- Tampón para el gel concentrador (Tris-HCl 0,5 M; SDS 0,4%; pH 6,8)⁴.
- Persulfato amónico.
- Glicina.
- Dodecil sulfato sódico (SDS).
- Iodoacetamida⁵.
- KCl.
- Na₂HPO₄.
- Tampón para el gel separador (Tris-HCl 1,5 M; SDS 10%; pH 8,8)⁴.
- Leche desnatada en polvo (no enriquecida en calcio).

- Tetrametiletilendiamina (TEMED).
- Tween 20.
- Reactivos de revelado ECL.
- Isopropanol.
- Tris-HCl.
- Anticuerpo primario anti-UCP-1⁵.
- Líquidos de revelado y de fijación para fotografía.
- Azul de bromofenol.
- Albúmina sérica bovina (BSA).
- Tris base.
- Anticuerpo secundario marcado con peroxidasa⁶.
- Luminol.
- Azida sódica.

³ Opcionalmente tabletas o cocktail comercial de inhibidores

⁴ Son tampones comerciales que se pueden elaborar en el laboratorio

⁵ Anticuerpo monoclonal o policlonal obtenido en conejo, cabra o ratón

⁶ Anti cabra, anti conejo o anti ratón

Tampones

- PBSa celular (para homogeneización de tejidos): 150 mM NaCl; 3 mM KCl; 3mM NaH₂PO₄; 7,5 mM Na₂HPO₄; 1 mM PMSF; 10 mM iodoacetamida (pH 7,4).
- PBSb (para bloqueo/anticuerpos): 80 mM Na₂HPO₄; 24,6 mM NaH₂PO₄; 10 mM NaCl (pH 7,4).
- PBS-T: PBSb + Tween 20 al 0,2%.
- Stock inhibidores:
 - PMSF 100 mM en isopropanol anhidro
 - Iodoacetamida 100 mM en agua destilada (fotosensible)
- PBSa + inhibidores 10 mL: 10 mL PBSa + 100 µL stock PMSF + 10 µL stock iodoacetamida.
- Tampón electroforesis: Tris 0,25 M; glicina 1,92 M; SDS 0,1% (pH 8,3).
- Tampón de carga (para las muestras):
 - 4,05 mL agua desionizada
 - 2,5 mL glicerol
 - 1,25 mL Tris-HCl 0,5M pH 6,8
 - 2 mL SDS 10%
 - 0,2 mL de azul de bromofenol al 0,5%

Se descongelan las muestras y se trasvasa a un tubo Eppendorf el volumen de homogenado que contenga 30 μg de proteínas, completando hasta un total de 15-20 μL con tampón de carga. Tras realizar un orificio en la tapa del tubo Eppendorf se desnaturalizan las proteínas calentando las muestras en un termobloque (95 $^{\circ}\text{C}$, 3 minutos). Por último, se les da un golpe de centrifuga para eliminar burbujas. A continuación se carga en los geles la totalidad de cada muestra en un carril, evitando la formación de burbujas y el trasvase de muestra entre carriles.

Finalmente, se colocan los electrodos haciendo coincidir los colores y se pone en marcha la fuente de alimentación a 150 V durante 50 minutos. El frente que delimita la banda azul del tampón de transferencia marca la marcha de las proteínas.

Electrotransferencia

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se han de transferir a una membrana de PVDF. Se ha de cortar la membrana para que alcance el mismo tamaño del gel desde el que se transferirán las proteínas. Al ser una membrana hidrófoba, se ha de sumergir durante 10 segundos en metanol, para posteriormente sumergir en tampón de transferencia durante unos 30 minutos. De igual modo, el aparataje a utilizar en la electrotransferencia ha de sumergirse en el tampón (sándwiches, esponjas y papeles absorbentes).

Se coloca sobre la parte negra de un sándwich una esponja y un papel. A continuación, se saca el gel de entre los vidrios (separando los mismos con cuidado) y se deposita sobre el papel. Es im-

portante no demorarse en el proceso de ensamblado del sándwich, ya que el gel no debe secarse (se puede humedecer con el tampón). Sobre el gel se coloca la membrana de PVDF y sobre ésta un papel absorbente mojado en tampón de electrotransferencia. Antes de colocar sobre este papel una esponja mojada en tampón de electrotransferencia, se pasa sobre el mismo un tubo de ensayo con la intención de quitar las posibles burbujas que se hubieran podido formar. Por último, se ensambla el conjunto (Fig. P44-1).

Se pueden transferir dos geles, pero si únicamente se va a hacer uno, hay que ensamblar el otro conjunto sin gel y sin membrana. Se coloca todo el conjunto (parte negra contra negra) en la cubeta. Como el proceso de electrotransferencia genera calor, es necesario refrigerar la cubeta llenando de hielo el recipiente preparado al efecto. Se rellena la cubeta con tampón de electrotransferencia, se coloca un agitador magnético (que ayuda a homogeneizar el medio y la temperatura) y se ensamblan los electrodos. Finalmente se ajusta la fuente a 90 V durante 70 minutos sobre un agitador magnético.

Hibridación

El proceso consiste en hibridar la proteína objetivo (ahora unida a la membrana PVDF) con un anticuerpo primario específico, el cual se hibrida después con un anticuerpo secundario marcado con una enzima (peroxidasa de rábano) que, en presencia de luminol, produce luz que recogeremos en un film fotosensible (Fig. P44-2).

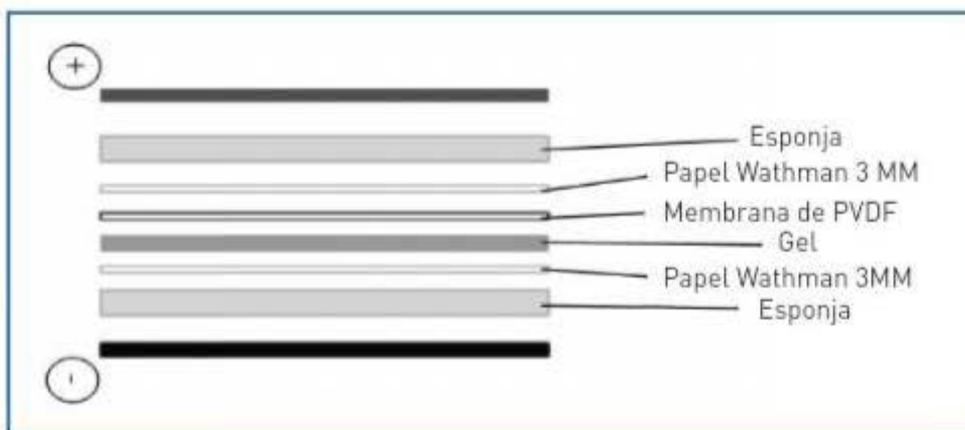


Figura P44-1. Sándwich para electrotransferencia.

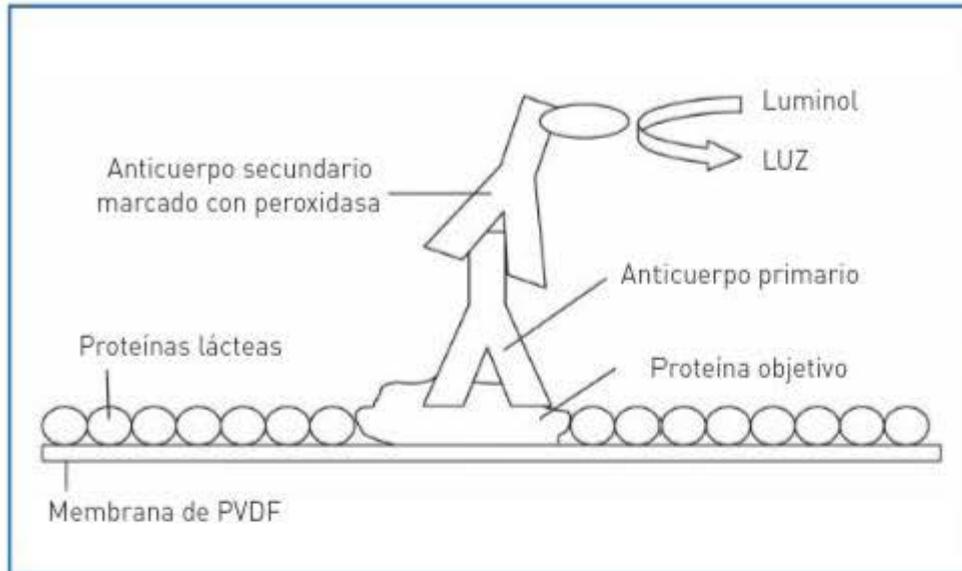


Figura P44-2. Hibridación.

Antes de que termine la transferencia es conveniente preparar una cubeta o tarrina de plástico con tampón de bloqueo, con el propósito de cubrir de proteínas (lácteas), las partes de membrana en las que no hay proteína transferida (o unida), puesto que de lo contrario, el anticuerpo se podría unir a toda la membrana. Se desensamblan los sándwiches y se sacan con cuidado las membranas. Si existe la duda de cómo se ha dado la electrotransferencia se puede comprobar que se han transferido las proteínas tiñendo la membrana con rojo Poinceau (tintura reversible lavando la membrana varias veces con acético al 5%).

Se incuba la membrana en tampón de bloqueo en el agitador durante una noche. Transcurrido este tiempo se lava el exceso del mismo con PBS-T (3 lavados de 10 minutos). Mientras se lava, se prepara el anticuerpo primario (ver sección de reactivos).

Terminado el último lavado, se incuba la membrana con el anticuerpo primario durante 90 minutos a temperatura ambiente o a 4 °C durante toda la noche. Tras esto se recicla el anticuerpo primario anotando los usos y se lava la membrana con PBS-T (3 lavados de 10 minutos). Mientras, se prepara el anticuerpo secundario. Se incuba la membrana con el mismo durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente se desecha el anticuerpo secundario y se lava la membrana con PBS-T (3 lavados de 10 minutos). En el último lavado se prepara el reactivo de revelado.

Revelado

Todo el proceso de revelado se ha de realizar en una sala acondicionada a tal efecto, completamente aislada de la luz y con una lámpara roja de fotografía.

Se mezclan 1,5 mL de cada uno de los reactivos de detección por quimioluminiscencia. Se vierten sobre la membrana con una pipeta, mojándola continuamente durante unos 3 minutos, o cubriéndola con luminol durante el mismo tiempo.

Se coloca la membrana entre dos transparencias limpias y se elimina el exceso de reactivo de detección pasando suavemente papel sobre las transparencias. Se lleva al cuarto de revelado y se mete en uno de los casetes de revelado, colocando un film fotográfico del tamaño apropiado sobre la membrana. Se cierra el casete y se realizan exposiciones a tiempos diferentes (de 30 segundos a 5 minutos), tras cuyo revelado se escoge la exposición más adecuada (evitando sub y sobreexposiciones).

Se obtiene de esta manera una o varias bandas oscuras correspondientes a la proteína a detectar. En caso de que el anticuerpo primario no fuese muy específico y se detecten varias bandas, existen varias opciones para identificar la banda que corresponde a nuestra proteína objetivo: a) se podría cargar un marcador de peso molecular que permite identificar la banda correspondiente a la proteína de interés, b) se podría cargar una muestra purificada (control positivo) comercial de nuestra

proteína objetivo, c) se podría realizar una prueba de control negativo hibridando la membrana con una mezcla del anticuerpo primario y la proteína empleada para generar el anticuerpo.

Los films se secan al aire, y una vez secos se puede proceder a la cuantificación de la expresión proteica de la UCP-1.

BIBLIOGRAFÍA

Burnette WN (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate—

polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203.
 Hames BD and Rickwood D (1998). *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach 3rd Edition*, The Practical Approach Series, Oxford University Press, Oxford.
 Harlow E and Lane D (1999). *Using Antibodies*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
 Nicholls DG, Locke RM (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64:1-64.
 Sahab ZJ, Semaan SM, Sang QX (2007). Methodology and applications of disease biomarker identification in human serum. *Biomark Insights* 14:21-43.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

La cuantificación de la intensidad de las bandas de proteína objetivo correspondientes a cada muestra se realiza escaneando la fotografía obtenida y procesando las imágenes con un software específico para densidad óptica.

Indicar los porcentajes de densidad óptica obtenidos para cada muestra.

N.º de muestra	Densidad óptica obtenida (unidades arbitrarias)



COMENTARIOS

Investigación con RNA y técnicas de PCR

E. Goyenechea Soto e I. Churruga Ortega

INTRODUCCIÓN

El concepto de genómica hace referencia al conjunto de ciencias y técnicas dedicadas al estudio de los genomas. La genómica está estrechamente relacionada con otras áreas de estudio como la transcriptómica, que estudia qué porción del genoma es transcrito a RNA mensajero, es decir, qué material genético es expresado en un tipo celular bajo unas condiciones dadas.

La transcriptómica ha tenido un importante auge en los últimos años, en los que se ha convertido en una herramienta imprescindible en investigación tanto básica, como aplicada, gracias a tecnologías avanzadas como es la denominada reacción en cadena de la polimerasa.

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*, es una técnica que permite identificar y amplificar un fragmento concreto de DNA. Se han desarrollado diferentes variantes de la PCR, entre las que destaca la RT-PCR, que combina la retrotranscripción (RT) con la PCR permitiendo cuantificar el nivel de expresión (RNA) de genes. Otra variante de la PCR es la PCR a tiempo real que aporta la ventaja de que, además de amplificar, permite cuantificar simultáneamente de forma absoluta el producto de la reacción y, por tanto, la cantidad de DNA o RNA en la muestra original.

OBJETIVO

El objetivo de la presente práctica es iniciarse en la transcriptómica y adquirir destreza en el manejo de la PCR. Para ello, se estudiará la expresión génica de dos genes proinflamatorios en tejido

adiposo de rata Zucker magra y obesa: el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y el factor nuclear kappa B (NF κ B). Se trata de genes relacionados con rutas metabólicas de la inflamación, como es el caso de la ruta metabólica que une la citoquina proinflamatoria TNF α con el factor de transcripción nuclear NF κ B.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Como se ha mencionado, la RT-PCR es una técnica de biología molecular que combina la retrotranscripción (RT), con la denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La retrotranscripción consiste en la síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA. La PCR permite la amplificación de secuencias diana específicas de DNA, para ello se utilizan secuencias cebadoras de DNA, oligonucleótidos de alrededor de 20 bases de longitud, que definen los extremos de la secuencia que se desea amplificar, a partir de los cuales una DNA polimerasa inicia la polimerización del cDNA en dirección 5' \rightarrow 3'.

Así, la RT-PCR constituye un método rápido, versátil y sensible para el análisis de la expresión génica. En la presente práctica será utilizada para cuantificar la expresión de RNA mensajero de los genes TNF α y NF κ B a partir de muestras de tejido adiposo (Tabla P45-1).

El tejido adiposo es capaz de secretar un gran número de adipocinas inflamatorias, entre las que se incluye el TNF α . La presencia de esta molécula en situación de obesidad permite relacionar esta patología con un estado inflamatorio de bajo

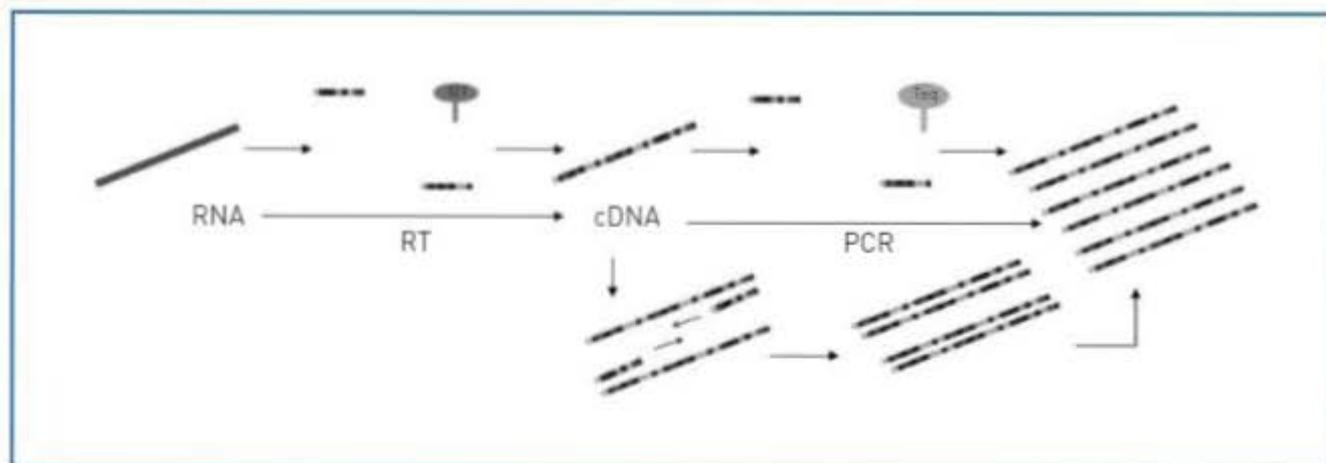


Figura P45-1. RT-PCR

grado. En el proceso inflamatorio vinculado a la obesidad cabe destacar la participación del NF κ B. Esta molécula forma parte de una familia de factores de transcripción inducibles que participan en la respuesta inmune y en la inflamación. El NF κ B regula decenas de genes involucrados en la respuesta inflamatoria, entre los que se encuentra el TNF α . En cuanto a su participación en la obesidad, se ha descrito una mayor expresión del factor de transcripción y de los genes proinflamatorios que regula en pacientes obesos.

Material y equipos

Muestras biológicas

Se trabajará con una población de 8 ratas, 4 de ellas serán ratas Zucker obesas (*fa/fa*) y 4 serán Zucker magras (*Fa/Fa*). Tras anestesia de los animales, se les realizará una biopsia del tejido adiposo subcutáneo (200 mg) por aspiración.

El RNA es una molécula que se degrada rápidamente, por lo que el proceso de obtención de muestras deberá ser rápido, las biopsias del tejido adiposo se limpiarán en agua con DEPC al 0,1% y se congelarán rápidamente en nitrógeno líquido pasando posteriormente a congeladores a -80°C donde se conservarán hasta su análisis. Una vez se hayan recogido todas las muestras a analizar se trabajará con todas a la vez.

Equipos y material

- Termociclador.

- Micropipetas.
- Homogenizador.
- Centrífuga.
- Puntas para micropipetas.
- Tubos Eppendorf (200 μL , 2 mL).

Nota: Todo el material de vidrio y plástico que se vaya a utilizar deberá ser estéril y libre de DNasas y RNasas.

Reactivos

- Trizol.
- Cloroformo.
- Isopropanol.
- Dietil pirocarbonato (DEPC).
- Etanol.
- DNasa, libre de RNasas, 10.000 U (10 U/ μL).
- Mezcla de retrotranscripción:
 - First Strand Buffer 5X.
 - Hexámeros aleatorios.
 - dNTPs.
 - Ditioneitol (DTT).
 - Rnasin (1 U/ μL).
 - Retrotranscriptasa (10 U/ μL).
- Mezcla de reactivos de PCR (con MgCl_2 , dNTPs, fluoróforo SYBR Green® y DNA polimerasa).
- Cebador sentido.
- Cebador antisentido.

Tabla P45-1. INFORMACIÓN REFERENTE A LOS GENES A ANALIZAR:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

Nombre del gen	Símbolo	Genbank
Factor de necrosis tumoral α	TNF α	NM_012675
Factor nuclear kappa B	NF κ B	XM_342346
β -actina	ACTB	NM_031144

Protocolo

Inicialmente, se deberá realizar la extracción de RNA a partir de las biopsias de tejido adiposo. Una vez verificada la integridad y pureza de la muestra obtenida se realiza la retrotranscripción del RNA para sintetizar DNA complementario. Posteriormente, mediante PCR se realiza el análisis de la expresión de los genes correspondientes (TNF α , NF κ B) (Tabla P45-1). Los datos se deben normalizar respecto a un gen de referencia, compensando así cualquier diferencia en la eficiencia de la retrotranscripción, por lo que se empleará el gen de referencia ribosomal β -actina. Finalmente se analizarán los resultados.

Extracción de RNA de biopsias del tejido adiposo

El RNA contenido en los adipocitos de las biopsias del tejido adiposo se extraerá utilizando trizol, siguiendo el siguiente procedimiento:

Homogenización

Se homogenizan 100 mg de muestra en 1 mL de trizol en tubos de homogenización limpios que se mantendrán en frío, en baño de hielo. La suspensión obtenida se pasa a un tubo Eppendorf y se centrifuga a 14.000 rpm durante 10 min y a 4 °C.

De esta forma se consigue precipitar en un "pellet" las membranas extracelulares, DNA de alto peso molecular, polisacáridos, etc., de la célula, mientras que el RNA quedará en el sobrenadante.

Separación de fases

Se recoge el sobrenadante en otro tubo Eppendorf y se deja reposar durante 5 minutos a tempe-

ratura ambiente para conseguir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente, se le añaden 200 μ L de cloroformo, se agita, se deja reposar durante 2-3 minutos y se vuelve a centrifugar a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.

Así, se obtienen 3 fases, el RNA estará en el sobrenadante, en la fase acuosa, que se recoge y se pasa a otro tubo Eppendorf.

Precipitación y resuspensión de RNA

Antes de recoger el RNA, es conveniente eliminar el DNA que pueda contener la muestra, para ello se precipita añadiendo 50 μ L de isopropanol al sobrenadante, se agita, se deja reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

Así, el DNA quedará en el "pellet" y el RNA en el sobrenadante, que se recoge en tubos Eppendorf nuevos. Para la precipitación del RNA se añaden 450 μ L de isopropanol, se agita, se deja reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se vuelve a centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

Esta segunda vez, dado que el porcentaje de isopropanol utilizado es mayor, el RNA precipita, quedando en el "pellet", por ello, se retira el sobrenadante y se realiza el lavado del "pellet" con 1.000 μ L de etanol al 75 %.

Finalmente, se resuspende el RNA obtenido en 35 μ L de agua con DEPC al 0,1%.

Análisis de las muestras de RNA obtenidas

Una vez finalizada la extracción de RNA, se determina la concentración y la calidad, integridad y pureza de la muestra obtenida por espectrofotometría. Para ello, se realiza una dilución 1:50 de las soluciones de RNA extraídas y se mide la absorbancia de las muestras a 260, 270, 280 y 310 nm.

A partir de la absorbancia a 260 nm, se calculará la concentración de RNA de la muestra, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (A_{260} \times 40 \times \text{Factor dilución})/100$$

Para determinar la calidad de la extracción, se calcularán los siguientes ratios:

$A_{260} / A_{280} \rightarrow$ Indicativo de la pureza de la muestra. Valores óptimos: 1,8-2.

$A_{260} / A_{270} \rightarrow$ Indicativo de presencia de restos de cloroformo. Valores óptimos: 1,2-1,8.

$A_{310} \rightarrow$ Indicativo de presencia de sales minerales. Los valores deberán ser $< 0,01$.

Tratamiento de las muestras de RNA con DNasa

Antes de realizar la retrotranscripción y la PCR, las muestras se tratan con DNasa para eliminar DNA genómico contaminante que puedan contener las muestras de RNA y evitar falsos positivos. Para ello, se añaden en tubos de PCR de 200 μ L:

RNA.....1,5 μ g
DNasa 10.000 U (10 U/ μ L).....1 μ L
H₂O-DEPC 0,1%.....c.s.p. 13 μ L

Se incubarán en el termociclador utilizando el siguiente protocolo:

37 °C \rightarrow 30 min - tiempo y condiciones para que el enzima actúe.

95 °C \rightarrow 5 min - para la inactivación del enzima.

Retrotranscripción

La retrotranscripción se realiza para obtener cDNA a partir de las hebras de RNA. Se prepara la mezcla de retrotranscripción según el número de muestras. El volumen para una muestra es el siguiente:

First Strand Buffer 5X.....6 μ L
Hexámeros aleatorios1,5 μ L
5 mM dNTPs (1 mM).....6 μ L
0,1 M DTT (10 mM)1,5 μ L
40 U/ μ L RNasin (1 U/ μ l).....0,75 μ L
200 U/ μ L retrotranscriptasa (10 U/ μ L).....1,5 μ L

Se agita ligeramente la mezcla en el vortex y se añade a los tubos donde se ha realizado la reacción de la DNasa 17 μ L de la mezcla de RT.

Este paso se realiza rápidamente, sin que se formen burbujas y sin que los tubos se sobrecalienten. Para la realización de la transcripción inversa, las muestras se incuban en el termociclador de la siguiente manera:

37 °C \rightarrow 60 min

95 °C \rightarrow 5 min

Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

La PCR consiste en amplificar secuencias génicas definidas mediante cebadores específicos que sirven como iniciadores de la polimerización. El proceso de amplificación se cuantifica a tiempo real mediante fluoróforos.

Para ello se reparten 0,1 μ L de cDNA en tubos de PCR de 200 μ L. Se prepara la mezcla de PCR según el número de muestras, el volumen para una muestra es el siguiente:

Mezcla de reactivos de PCR
(con MgCl₂, dNTPs, fluoróforo
SYBR Green® y DNA polimerasa).....12,5 μ L
Cebador sentido 300nM1,5 μ L
Cebador antisentido 300nM1,5 μ L

Se agita ligeramente la mezcla en el vortex y se añade a cada uno de los tubos con cDNA 15,5 μ L de mezcla de PCR. Este proceso se realiza rápidamente, sin que se formen burbujas y sin que los tubos se sobrecalienten. Para la realización de la PCR, las muestras se deben incuban en el termociclador siguiendo el siguiente protocolo:

Desnaturalización inicial: 95 °C \rightarrow 10 min
40 ciclos: Desnaturalización: 95 °C \rightarrow 15 seg
Emparejamiento: 60 °C \rightarrow 30 seg
Extensión: 60 °C \rightarrow 30 seg

La PCR se realiza por separado para cada uno de los genes de estudio, TNF α y NF κ B, y para un patrón interno, la β -actina. Todas las medidas se realizarán por triplicado.

Cálculos

Los resultados de amplificación de cada gen para cada muestra se representan como Ct (*Threshold Cycle*), que corresponde al ciclo en que la curva de amplificación cruza la recta correspondiente al umbral de detección (Fig. P45-2).

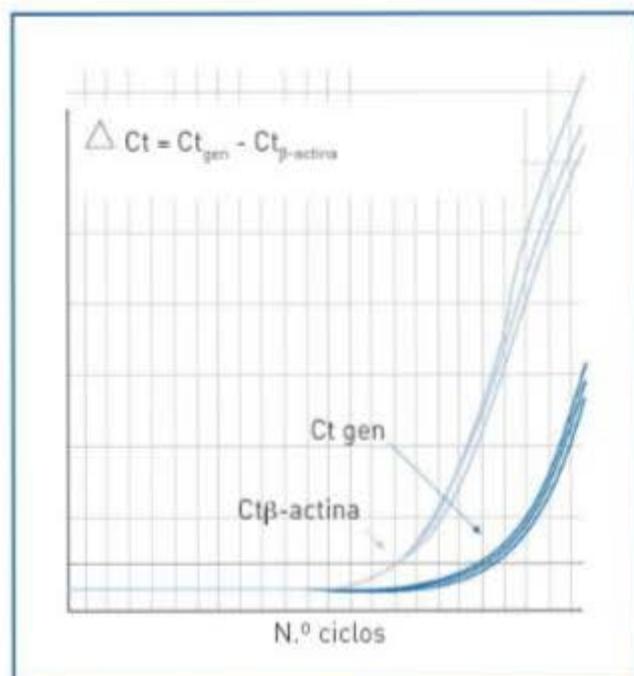


Figura P45-2. Curva de amplificación de un gen y su patrón interno.

Se trabaja siempre con un gen de referencia, la β -actina en este caso; para el procesamiento de los datos se calcula la diferencia de amplificación entre el gen objeto de estudio y el patrón interno:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen}} - Ct_{\beta\text{-actina}}$$

Una vez se ha obtenido el ΔCt de cada muestra, se realiza la comparación entre grupos mediante el método de $2^{-(\Delta Ct)}$. Así, en primer lugar se calcula la media de los valores de ΔCt de cada grupo y posteriormente se realiza la comparación entre grupos por diferencia entre los mismos:

Tabla P45-2. EJEMPLO DE RESULTADOS

Grupo	Media ΔCt	$\Delta \Delta Ct$	$2^{-(\Delta \Delta Ct)}$
Control	2	0	1
Estudio	4	2	0,25

$$\Delta \Delta Ct = \text{Media } \Delta Ct_{\text{grupo estudio}} - \text{Media } \Delta Ct_{\text{grupo control}}$$

Finalmente, se realiza la siguiente operación: $2^{-(\Delta \Delta Ct)}$ al resultado obtenido para cada grupo para llegar a resultados con valores relativos dando un valor de 1 al grupo control (Tabla P45-2).

BIBLIOGRAFÍA

- Abete I, Parra MD, Zulet MA, Martínez JA (2006). Different dietary strategies for weight loss in obesity: role of energy and macronutrient content. *Nutr Res Rev* 19:5-17.
- Goyenechea E, Parra D, Crujeiras AB, Abete I, Martínez JA (2009). A nutrigenomic inflammation-related PBMC-based approach to predict the weight-loss regain in obese subjects. *Ann Nutr Metab* 54:43-51.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25:402-408.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (2008). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Recasens M, Ricart W, Fernández-Real JM (2004). Obesidad e inflamación. *Rev Med Univ Navarra* 48:49-54.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



1. Analizar las curvas de amplificación obtenidas para los genes estudiados, determinar los valores Ct de cada una de ellas y dar el valor medio de las tres repeticiones.

Muestra	Ct	Muestra	Ct	Muestra	Ct	Muestra	Ct
M- TNF α 1		O- TNF α 1		M- β -actina 1		O- β -actina 1	
M- TNF α 2		O- TNF α 2		M- β -actina 2		O- β -actina 2	
M- TNF α 3		O- TNF α 3		M- β -actina 3		O- β -actina 3	
M- TNF α 4		O- TNF α 4		M- β -actina 4		O- β -actina 4	

Muestra	Ct	Muestra	Ct	Muestra	Ct	Muestra	Ct
M- NFκB 1		O- NFκB 1		M- β-actina 1		O- β-actina 1	
M- NFκB 2		O- NFκB 2		M- β-actina 2		O- β-actina 2	
M- NFκB 3		O- NFκB 3		M- β-actina 3		O- β-actina 3	
M- NFκB 4		O- NFκB 1		M- β-actina 4		O- β-actina 4	

M: Magra. O: Obesa.

2. Obtener los datos de ΔCt de cada gen respecto al patrón interno.

Muestra	ΔCt	Muestra	ΔCt
M- NFκB 1		O- NFκB 1	
M- NFκB 2		O- NFκB 2	
M- NFκB 3		O- NFκB 3	
M- NFκB 4		O- NFκB 4	
M- TNFα 1		O- TNFα 1	
M- TNFα 2		O- TNFα 2	
M- TNFα 3		O- TNFα 3	
M- TNFα 4		O- TNFα 4	

3. Comparar la expresión génica de TNFα y NFκB entre los grupos tratados y control.

GEN	Media ΔCt	$\Delta \Delta Ct$	$2^{-\Delta \Delta Ct}$
M- TNFα O- TNFα			
M- NFκB O- NFκB			

4. Conclusiones

COMENTARIOS



Nutrigenética y epigenética: técnicas de SNP y MSP

P. Cordero Sánchez, F. I. Milagro Yoldi y J. Campión Zabalza

INTRODUCCIÓN

Entre el 40 y el 70 % del peso corporal se ha atribuido a la herencia genética, con más de 600 regiones cromosómicas potencialmente implicadas. La nutrigenética estudia la relación entre las diferencias interindividuales en la secuencia del ADN y la distinta respuesta a la ingesta de los nutrientes. A otro nivel, la epigenética se centra en el estudio de modificaciones covalentes sobre el ADN que, sin variar su secuencia de nucleótidos, puede regular su expresión.

Los polimorfismos son variaciones en un punto determinado de la secuencia nucleotídica del ADN presentes en más del 1% de la población y que pueden estar asociados a patologías como la obesidad y otras enfermedades metabólicas. Los más estudiados son aquéllos en los que un nucleótido es sustituido por otro. Su diagnóstico puede llevarse a cabo mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de discriminación alélica y ayudar al establecimiento de un tratamiento nutricional basado en el genotipo individual.

El principal mecanismo de regulación epigenética resulta de la adición de un grupo metilo en ci-

tosinas seguidas de guanina (sitios CpG). Estos dímeros abundan en regiones promotoras de muchos genes y un aumento en su metilación está con frecuencia asociado a una represión en la expresión del gen. Este patrón de metilación es potencialmente heredable por la descendencia y modificable por los hábitos dietéticos y estilos de vida (Fig. P46-1).

OBJETIVO

Los objetivos de esta sesión práctica son determinar la presencia de un polimorfismo en la secuencia de ADN (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) y analizar los niveles de metilación del ADN en una zona concreta de la región promotora de un gen (MSP, *Methylation Specific PCR*).

PROCEDIMIENTO

Fundamento

PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Esta técnica de biología molecular tiene como objetivo la amplificación de un fragmento defi-

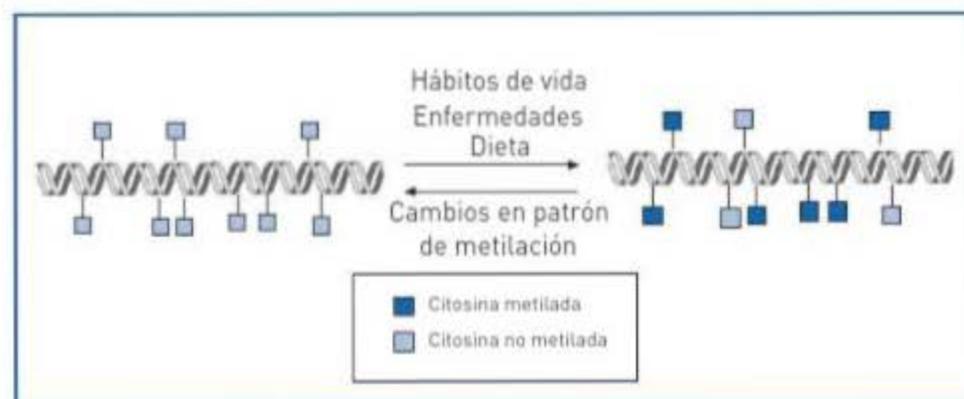


Figura P46-1. Regulación del patrón de metilación del ADN.

nido de ADN presente en una muestra. El proceso se basa en la repetición de una serie de ciclos, normalmente entre 25 y 40, con las siguientes fases:

1. Desnaturalización, en la que se produce la separación de las hebras de ADN a alta temperatura.
2. Unión de los cebadores a su secuencia complementaria de ADN a partir de la cual se iniciará la replicación. La temperatura de este proceso varía entre 50 y 65 grados dependiendo del número de nucleótidos de los cebadores y de su proporción de bases púricas y pirimidínicas.
3. Elongación: la enzima ADN polimerasa sintetiza una nueva hebra complementaria a la molde en sentido $5' \rightarrow 3'$, siendo la más empleada la *Taq polimerasa*, de actividad óptima a 72°C (Fig. P46-2).

El aparato empleado para llevar a cabo la reacción es un termociclador. Cuando se requiere monitorizar a tiempo real la reacción de PCR (rtPCR) se le acopla un medidor de fluorescencia y los cebadores se diseñarán para que durante el proceso de elongación desprendan moléculas emisoras de fluorescencia.

SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Su determinación está basada en una PCR a tiempo real. Las sondas Taqman diseñadas son complementarias a cada uno de los alelos de los SNP y están marcadas con distintos fluorocromos (normalmente VIC y FAM). Mediante la detección de la fluorescencia emitida por cada una de las sondas durante la PCR se puede conocer el genotipo del polimorfismo (Fig. P46-3).

MSP (Methylation Specific PCR)

La realización de esta técnica requiere un tratamiento previo del ADN con bisulfito sódico para transformar las citosinas no metiladas en uracilos, mientras que las metiladas permanecerán inalteradas (Fig. P46-4).

Se diseñan los cebadores para analizar la metilación de una zona CpG específica, normalmente la región promotora de un gen. Los cebadores amplifican una secuencia de 300 pares de bases de tamaño máximo y son diseñados en parejas tanto para el ADN metilado como para no metilado.

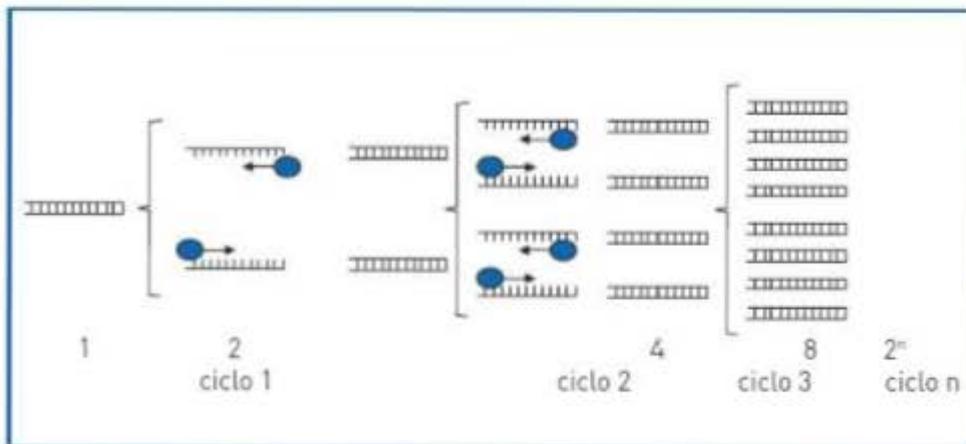


Figura P46-2. Amplificación del ADN durante la PCR.

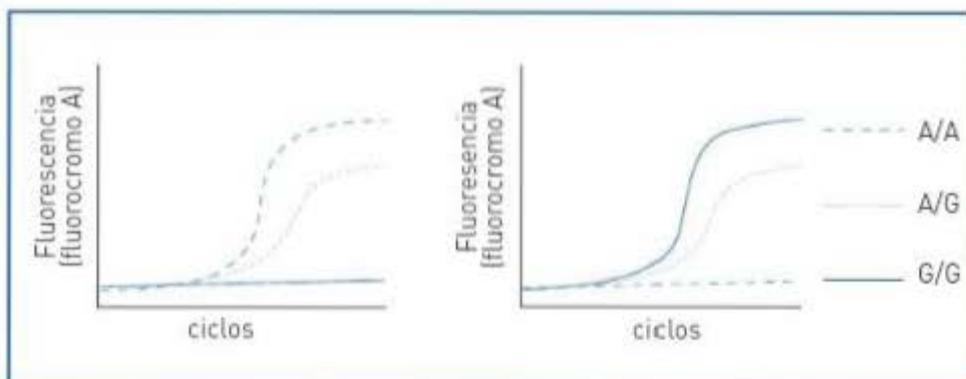


Figura P46-3. Detección de un SNP mediante discriminación alélica de fluorescencia.

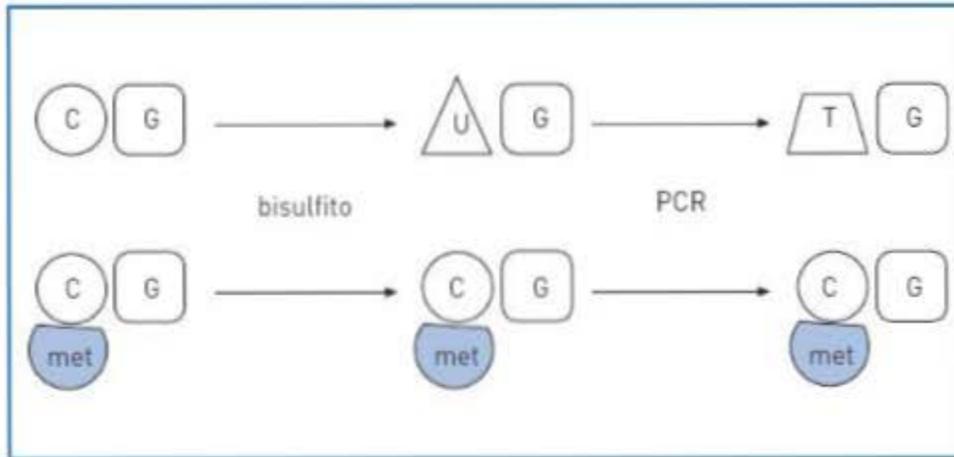


Figura P46-4. Tratamiento con bisulfito de citosinas metiladas y no metiladas, donde se puede apreciar que la citosina no metilada tras la reacción de PCR pasa a timina y la metilada se mantiene.

Posteriormente a la reacción de PCR se realiza una electroforesis en gel de agarosa cuantificando mediante un transiluminador la intensidad de cada una de las dos bandas amplificadas para cada muestra; para el ADN metilado y para el no metilado (Fig. P46-5).

Material y equipos

Extracción de ADN

- Kit para la extracción de DNA, disponible en distintas casas comerciales.
- Microcentrifuga.
- Espectrofotómetro.



Figura P46-5. Gel de agarosa para el análisis de la metilación de dos muestras.

SNP

- Termociclador con medidor de fluorescencia.
- Sondas Taqman marcadas con distintos fluorocromos (VIC y FAM).
- Reactivos para la PCR a tiempo real.

MSP

- Termociclador.
- Equipo de electroforesis.
- Transiluminador.
- Kit para tratamiento con bisulfito sódico.
- Reactivos para la PCR (ADN polimerasa, Buffer 10 X, $MgCl_2$, nucleótidos y agua de biología molecular).
- Cebadores para ADN metilado y no metilado.
- Agarosa.
- Tinción SYBR de ADN para geles.
- Tampón TBE.

Protocolo

Extracción de ADN

La obtención del ADN genómico de partida para los posteriores análisis se realiza mediante el protocolo de extracción del kit específico para extracción de DNA. La calidad y cantidad del ADN final se analiza por espectrofotometría.

SNP

Para el análisis de la presencia de un polimorfismo en una población hay que tener en cuenta

tanto su prevalencia en la muestra como su posible repercusión en el ámbito de investigación que se quiera realizar, en nuestro caso con la salud. Para ello, existen distintas bases de datos como la del proyecto HapMap (www.hapmap.org), un proyecto de desarrollo de un mapa de haplotipos del genoma humano.

Tras la elección del polimorfismo de interés se seleccionan sus cebadores comerciales correspondientes marcados con los fluorocromos VIC y FAM según el haplotipo.

Para la PCR se añaden 5 µL de muestra de ADN genómico a una concentración de 10 ng/µL, 4,5 µL de MASTER MIX comercial preparada y 0,25 µL de la sonda marcada con fluorocromo específico en cada pocillo de la muestra. Se realizan duplicados de cada muestra para cada una de las dos sondas marcadas. La programación de la reacción de PCR en el termociclador con medidor de fluorescencia integrado será de 40 ciclos de copia con una temperatura durante la fase de unión de los cebadores de 72 °C.

Para el análisis de los resultados, comparar los obtenidos con la figura P46-3.

MSP

Tratar 1 µg de ADN genómico con el kit de bisulfito sódico siguiendo el protocolo.

El diseño de los cebadores se realiza mediante el programa informático METHPRIMER (www.urogene.org/methprimer/index1.html). Primero se selecciona la zona a estudio: el promotor (o, en ocasiones, inicio de la transcripción) de un gen, de aproximadamente 1.000 pares de bases previos al inicio de la transcripción, con alta densidad de sitios CpG, denominada isla CpG. Los cebadores resultantes deben ser optimizados para conocer su temperatura óptima para la unión al ADN (se recomienda realizar una PCR en un ter-

mociclador con gradiente de temperatura), así como el número de ciclos de amplificación para poder apreciar con nitidez las bandas de la PCR en un gel de agarosa, pero sin llegar a una saturación en su exposición.

Tras la optimización de los cebadores se realiza una PCR a número de ciclos óptimo añadiendo 1 µL del ADN tratado con bisulfito, 2,5 µL de Buffer 10X, 1,5 µL de MgCl₂, 0,2 µL de la enzima ADN polimerasa, 1 µL de un mix de los 4 nucleótidos a 20 mM, 1 µL del mix de cebadores a 20 mM y c.s.p. 25 µL de agua de biología molecular.

Tras la reacción de amplificación se realiza un gel con TBE 1X y 1,5% de agarosa con tinción SYBR de ADN. A los productos de la amplificación se le añaden 5 µL de tampón de carga y se cargan en el gel, dejándolo correr en la cubeta de electroforesis con TBE 1X durante 1 hora a 100 voltios.

El gel resultante se analiza con un transiluminador, con el que se cuantifica la intensidad de cada una de las bandas, la referente al ADN metilado y la de ADN no metilado.

$$\% \text{ metilación} = \frac{\text{intensidad banda metilada}}{\text{intensidad banda metilada} + \text{intensidad banda no metilada}} \times 100$$

BIBLIOGRAFÍA

- Campión J, Milagro FI, Martínez JA (2009). Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 10: 83-392.
- Cordero P, Milagro FI, Campión J, Martínez JA (2010). Epigenética nutricional: una pieza clave en el rompecabezas de la obesidad. *Rev Esp Obes* 8:10-20.
- Livak KJ (1999). Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 14:143-149.
- Ordovas JM, Mooser V (2004). Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr Opin Lipidol* 15:101-108.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



SNP

Tipo de polimorfismo.

MSP

Porcentaje de metilación.



COMENTARIOS

A large, empty light blue rectangular area intended for writing comments or notes.

Diferenciación del perfil metabólico de individuos mediante una estrategia metabolómica no dirigida

I. Bondia-Pons y J. A. Martínez Hernández

INTRODUCCIÓN

La metabolómica es la disciplina ómica dedicada al estudio global del metaboloma o conjunto de metabolitos endógenos y exógenos de bajo peso molecular (< 1.000 Da) presentes en un sistema biológico. Esta tecnología tiene como objetivo estudiar la dinámica, composición, interacciones y respuestas multiparamétricas del metaboloma a estímulos fisiopatológicos, cambios del entorno o modificaciones genéticas. La aplicación de esta metodología en muestras biológicas (p. ej., plasma, suero, orina, saliva o tejido adiposo) puede resultar de gran utilidad para la identificación de nuevos biomarcadores de salud, enfermedad y/o otros procesos patológicos, además de nuevos indicadores en nutrición que reflejen la ingesta de determinados alimentos y el efecto que éstos o sus componentes producen en el metabolismo humano.

Desde un punto de vista técnico, se diferencian dos tipos de estrategias en metabolómica. Las primeras se denominan estrategias dirigidas y se centran en el análisis cuantitativo de un grupo de metabolitos relacionados con una ruta metabólica específica o con una determinada familia química de metabolitos. En cambio, las estrategias no dirigidas se basan en comparar perfiles metabólicos (p. ej., comparación del perfil metabolómico de individuos con síndrome metabólico e individuos sanos; de individuos con diabetes de tipo 1 e individuos con diabetes de tipo 2; etc.).

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es familiarizarse con las diferentes etapas de un estudio metaboló-

mico no dirigido, mediante la caracterización de los perfiles metabólicos de individuos con un estado fisiopatológico diferente a través del análisis de muestras de suero.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

La aplicación de plataformas metabolómicas para caracterizar perfiles metabólicos de muestras biológicas presenta la característica de generar un elevado número de datos en la etapa de adquisición. Las muestras de suero son analizadas en esta práctica por cromatografía de líquidos (UPLC, *Ultra Performance Liquid Chromatography*) y espectrometría de masas (TOF-MS, *Time Of Flight Mass Spectrometry*). El elevado número de iones resultantes del análisis analítico requiere del uso de herramientas bioinformáticas para su procesamiento, así como de técnicas quimiométricas de reducción de datos. Estas técnicas permiten una mejor visualización de los datos para su interpretación. El análisis estadístico utilizado es de tipo multivariante, abarcando métodos no supervisados y supervisados. El caso más sencillo de análisis multivariante es el análisis de componentes principales (PCA). Los componentes principales explican la variancia de las muestras, de forma que aquellas muestras que presentan un perfil metabólico similar aparecen agrupadas en una representación gráfica denominada "*scores plot*". Un segundo gráfico, el "*loadings plot*", muestra aquellos iones responsables del agrupamiento de las muestras observado en el "*score plot*" (ver presentación de resultados). La distancia de un ión

del origen de coordenadas representa la influencia de ese ión en las componentes PCA.

En el caso de una plataforma basada en LC-MS como la de esta práctica, cada marcador (ión) viene caracterizado por su masa molecular exacta, su tiempo de retención y su intensidad, generándose una lista de biomarcadores potencialmente responsables de las diferencias halladas entre los dos grupos. Un sencillo test *t* entre ambos grupos de muestras permite reducir la lista de biomarcadores a aquellos iones significativamente diferentes.

El siguiente paso consiste en identificar los iones responsables de las diferentes agrupaciones de muestras. Esta etapa se realiza mediante el uso de herramientas de composición elemental, la búsqueda en bases de datos de metabolitos, la fragmentación de iones moleculares utilizando MS/MS, y por comparación con patrones en el caso de que éstos existan. Esta etapa conlleva la mayor parte del tiempo de un estudio metabolómico y es de gran importancia, ya que sin una identificación rigurosa de metabolitos, el descubrimiento de perfiles metabólicos diferentes mediante los análisis estadísticos multivariantes deja de tener sentido. Finalmente, una vez identificados los marcadores, éstos son integrados en las rutas metabólicas conocidas para poder interpretar biológicamente sus variaciones. Según los expertos, actualmente todavía es muy difícil interpretar los cambios en la concentración de un metabolito en un contexto dado, demostrando que aún queda mucho trabajo en este campo multidisciplinar de gran futuro.

Material y equipos

Muestras

- Suero de individuos con un estado fisiopatológico A.
- Suero de individuos con un estado fisiopatológico B.

Las muestras deben conservarse a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ desde el momento de su recogida hasta su posterior análisis para evitar su degradación.

Equipos

- Equipo de cromatografía líquida de alta resolución ultra acoplado a un detector de masas de tiempo de vuelo (UPLC-MS-TOF).

Material

- Homogeneizador vortex.
- Centrifuga.
- Columna cromatográfica C_{18} (100 mm \times 2,1 mm \times 1,7 μm).
- Filtros de celulosa para HPLC.
- Material básico de laboratorio (vasos de precipitados, pipetas, tubos Eppendorf).

Reactivos

- Acetonitrilo, metanol y ácido fórmico (grado analítico HPLC).
- Agua destilada Milli-Q (18,2 M Ω).

Protocolo

Preparación de muestra

La preparación de la muestra consiste básicamente en desproteinizar las muestras de suero con metanol. Conviene trabajar en frío para evitar la degradación de metabolitos. Tras descongelar las muestras a temperatura ambiente, se añaden 600 μL de metanol a 200 μL de suero y se agita vigorosamente en vortex. Tras dejar reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos, se procede a su centrifugado en frío ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) a 12.000 \times g durante 10 minutos. Finalmente, se filtra el sobrenadante a través de un filtro de celulosa.

Adquisición de datos por UPLC-MS-TOF

La adquisición de datos consiste en una primera etapa de separación cromatográfica, basada en la polaridad e interacciones entre los metabolitos presentes en la muestra y la fase estacionaria y fase móvil, seguida de una etapa de detección mediante espectrometría de masas, en la que los metabolitos son ionizados a la entrada del espectrómetro. Los iones formados son analizados y detectados en base a sus tiempos de vuelo. Como ejemplo se muestran las condiciones cromatográficas y de detección por espectrometría de masas optimizadas para el caso de la separación de suero de individuos con diabetes de tipo 2 e individuos sanos.

Condiciones cromatográficas

Fases móviles: agua con 0,1% de ácido fórmico (fase móvil A) y acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico (fase móvil B); gradiente de elución lineal: 5-95% B (en 15 min) a 0,4 mL/min; condiciones isoterma: T = 35 °C; volumen de inyección: 5 µL muestra.

Condiciones del espectrómetro de masas

Modos de ionización: positivo y negativo por electrospray (voltaje capilar: 2,4 kV; voltaje cono: 35 V); velocidad del gas de desolvatación (350 °C): 750 L/h; velocidad del gas del cono: 30 L/h; temperatura de la fuente de iones: 110 °C; velocidad de adquisición de datos: 0,2 s (0,1 s de retraso entre barridos electrónicos [escaneos]); modo de adquisición de datos: centroide; rango de masa (m/z): 100-1.000.

Los iones detectados en esta etapa vienen caracterizados por tres variables: su masa, su tiempo de retención y su intensidad relativa al resto de iones detectados.

El número de iones detectados en este tipo de plataformas es muy elevado, y es necesario disponer de una etapa de preprocesamiento, que utiliza diferentes algoritmos matemáticos y programas informáticos específicos (XCMS, MZMINE, MassLynx, etc.), para llevar a cabo operaciones de filtrado espectral, detección de picos y alineación entre otras. Entre los parámetros de preprocesamiento de datos a fijar en todo método se encuentran el tiempo de retención, el rango de masas, la tolerancia de masa, la intensidad mínima de detección de pico, la ventana de masa, la ventana de tiempo de retención y el nivel de eliminación de ruido.

El resultado obtenido de esta etapa es un conjunto de cromatogramas y espectros para los iones detectados, que se traduce en una tabla de tiempos de retención, m/z e intensidades para todos los picos detectados.

Procesamiento de datos

Para el desarrollo de esta práctica se ha escogido el análisis de componentes principales (PCA).

Identificación de biomarcadores

La identificación de metabolitos se lleva a cabo comparando los datos espectrales (masa exacta, masa de fragmentos, distribución de patrones isotópicos) con los datos disponibles en bases de datos de metabolitos (p. ej., *Human Metabolome DataBase*, <http://www.hmdb.ca/>), por análisis con MS/MS y por comparación con patrones.

Los metabolitos deben ser clasificados como: (a) desconocido (si no se ha logrado su identificación); (b) perteneciente a una familia química específica; (c) putativamente identificado por su patrón de fragmentación al aplicar MS/MS; (d) confirmado mediante el uso de un patrón de referencia.

Interpretación biológica. Inserción de biomarcadores en rutas metabólicas

La última etapa consiste en interpretar en un contexto biológico los cambios observados en los biomarcadores. Cuando un metabolito es identificado y se incorpora a una ruta metabólica, su localización en dicha ruta puede servir a su vez como punto de partida para identificar otros metabolitos adicionales hasta entonces desconocidos, pero que al estar relacionados estructuralmente, pueden acabar perteneciendo a esa misma vía metabólica. La interpretación se consigue si se logra comprender la función biológica de los metabolitos identificados en la matriz estudiada.

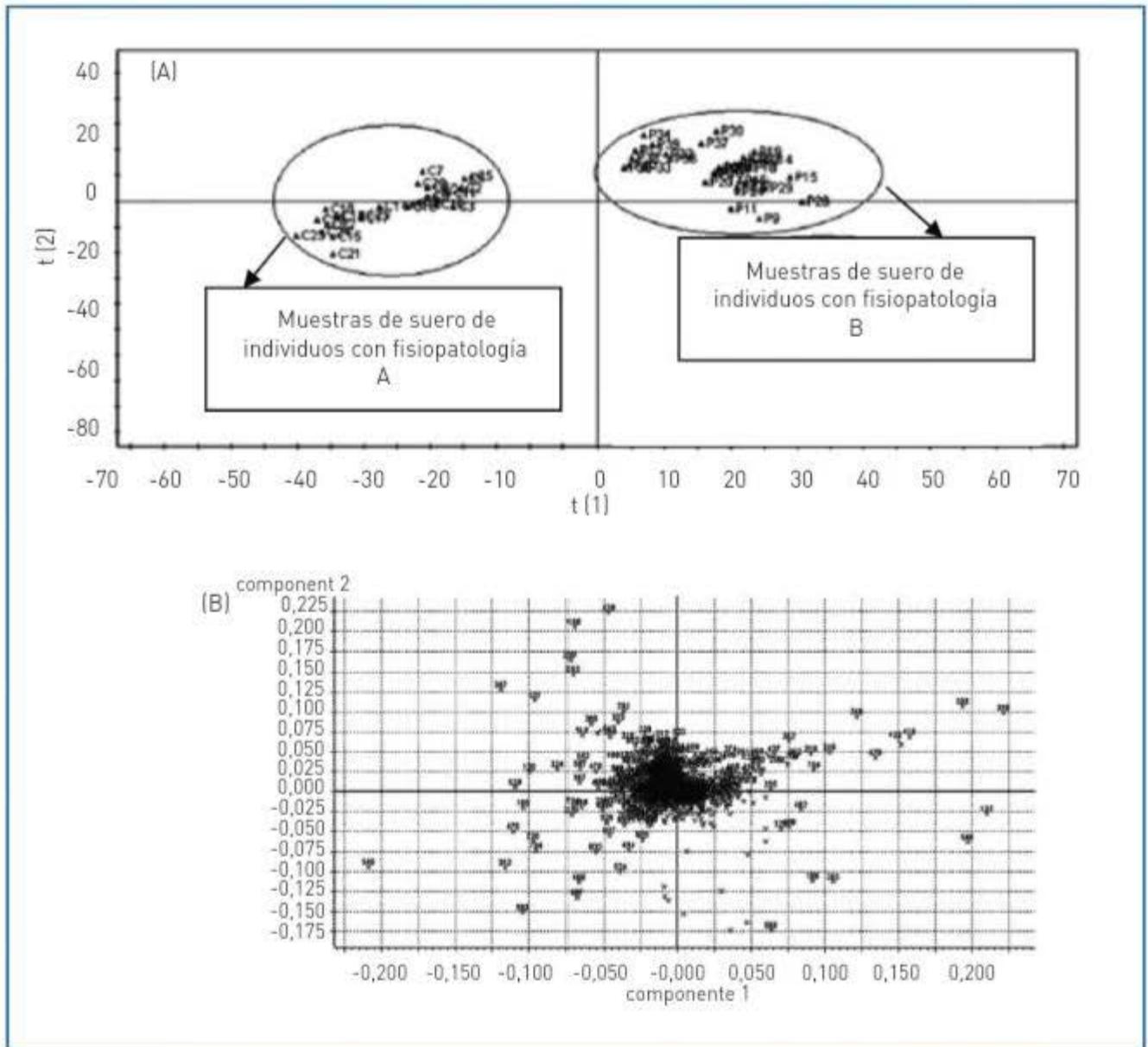
A pesar de los esfuerzos realizados en establecer conexiones claras entre biomarcadores y rutas metabólicas, actualmente todavía es muy difícil interpretar los cambios en la concentración de un metabolito en un contexto dado.

BIBLIOGRAFÍA

- Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW, Goodacre R (2007). Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics* 8,1243-1266.
- Nordström A (2008). Data Mining for Metabolomics. *Metabolomics, Metabonomics and Metabolite Profiling*, Griffiths WJ. RSC Biomolecular Sciences Publishing, Cambridge (UK).
- Orešić M (2009). Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease* 19,816-824.
- Rezzi S, Ramadan Z, Fay LB, Kochhar S (2007). Nutritional metabonomics: applications and perspectives. *Journal of Proteome Research* 6,513-525.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Análisis de componentes principales (PCA) para las muestras de suero analizadas: (A) *Score plot*; (B) *Loadings plot*.



COMENTARIOS

48. Nutrición enteral
49. Confección de dietas: ingestas dietéticas de referencia y tablas de composición de alimentos
50. Programa informático para la valoración del estado nutricional y la confección de dietas
51. Preparación de una dieta de adelgazamiento en una situación de sobrepeso
52. Estudio SUN (Seguimiento Universidad de Navarra)
53. Elaboración de un protocolo de ética para estudios de intervención en humanos
54. Búsqueda bibliográfica
55. Estadística

INTRODUCCIÓN

La nutrición enteral (NE) es la técnica de soporte nutricional artificial (SNA) por la que se aportan los nutrientes al aparato digestivo, pese a la imposibilidad del paciente de ingerir alimentos por vía oral. Su objetivo es mejorar la ingesta nutricional así como mantener o mejorar el estado nutricional del paciente. El empleo de NE requiere que el tracto gastrointestinal se encuentre anatómica y funcionalmente útil y tiene la característica de la utilización de fórmulas diseñadas específicamente para alimentación enteral.

Este tipo de nutrición presenta las características de que se emplea sondas para su administración y se suprime las etapas bucal y esofágica de la digestión. Como excepción se considera NE cuando los pacientes pueden tomar por vía oral los preparados (fórmulas de NE) destinados a la nutrición por sonda.

La NE es beneficiosa especialmente en pacientes desnutridos o con riesgo de presentar desnutrición. Por ello, para un correcto empleo de la NE, se debe identificar a los enfermos que más se van a favorecer con ella. Su empleo presenta una serie de ventajas frente a la otra técnica de SNA (nutrición parenteral), ya que es más fisiológica, más sencilla en su manejo, más fácil de preparar y administrar, y es una técnica con un número inferior de complicaciones y con menor coste.

A estas ventajas se une la evidencia experimental de que la presencia de nutrientes en la luz intestinal es esencial para el crecimiento y funcionalidad de la mucosa gastrointestinal con lo que se logra mantener sus funciones digestiva y de absorción, así como sus mecanismos “de ba-

rrera” que impiden el paso de sustancias extrañas o bacterias (traslocación). Por tanto, el coeficiente riesgo/beneficio está a favor de la NE cuando el tracto gastrointestinal está anatómica y funcionalmente intacto y se administra con la técnica adecuada, debiendo reservarse la nutrición parenteral como una segunda opción. Todo esto, unido a los avances en sistemas de acceso enteral, equipos de infusión, y en las formulaciones de nutrientes, ha llevado a un fuerte incremento en el empleo de la NE, tanto en el ámbito hospitalario como en el domiciliario.

Para una adecuada utilización de la técnica de NE es preciso conocer sus indicaciones de uso, así como llegar a evaluar si el tracto gastrointestinal está en condiciones de emplearse con seguridad y efectividad. También deben conocerse los criterios básicos que permiten realizar una correcta elección de la vía de acceso a emplear, método de administración y tipo de fórmula a infundir. De la misma manera resulta esencial estar familiarizado con las distintas complicaciones que pueden producirse tras la instauración de una NE.

OBJETIVO

La finalidad de la práctica consiste en valorar la posible indicación de un soporte SNA así como llevar a cabo el cálculo de los requerimientos nutricionales y la elección de la fórmula de SNA más adecuada. Igualmente se pretende seleccionar la vía de aporte, el método de administración más apropiado e intentar predecir las posibles complicaciones imputables al SNA seleccionado.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Se plantea el caso clínico de un paciente que presenta riesgo de desnutrición y puede beneficiarse de SNA. Se debe disponer de la siguiente información básica:

- Motivo de ingreso.
- Diagnóstico.
- Sexo, edad, talla, peso actual, peso habitual, pérdida de peso reciente.
- Historia clínica y dietética.
- Examen físico nutricional.
- Parámetros bioquímicos (hemograma, proteínas séricas).
- Funcionalidad del tracto gastrointestinal.
- Otros datos que se consideren de interés.

Con los datos suministrados se procede al desarrollo de la práctica, que consiste en el planteamiento de la intervención nutricional más adecuada.

Material

- Herramienta de cribado nutricional: *Malnutrition Universal Screening Tool* (MUST) (Figura P48-1).

- Ecuación de Harris-Benedict:

$$\text{GEB (hombres)} = 66,5 + (13,7 \times P) + (5 \times A) - (6,8 \times E)$$

$$\text{GEB (mujeres)} = 655,1 + (9,6 \times P) + (1,8 \times A) - (4,7 \times E)$$

Donde: GEB: gasto energético basal; P: peso en kg; A: altura en cm; E: edad en años.

- Peso corporal ajustado (PCA).

$$\text{PCA} = [(\text{peso actual} - \text{peso ideal}) \times 0,25] + \text{peso ideal}$$

- Factor de corrección o estrés. Según el cálculo del nitrógeno urinario o situación clínica que presenta el paciente (Tabla P48-1).
- Necesidades proteicas
 - No estrés: 1-1,2 g/kg/día
 - Estrés leve: 1,3-1,4 g/kg/día
 - Estrés moderado: 1,5-1,6 g/kg/día
 - Estrés severo: > 1,6 g/kg/día (no más de 2)

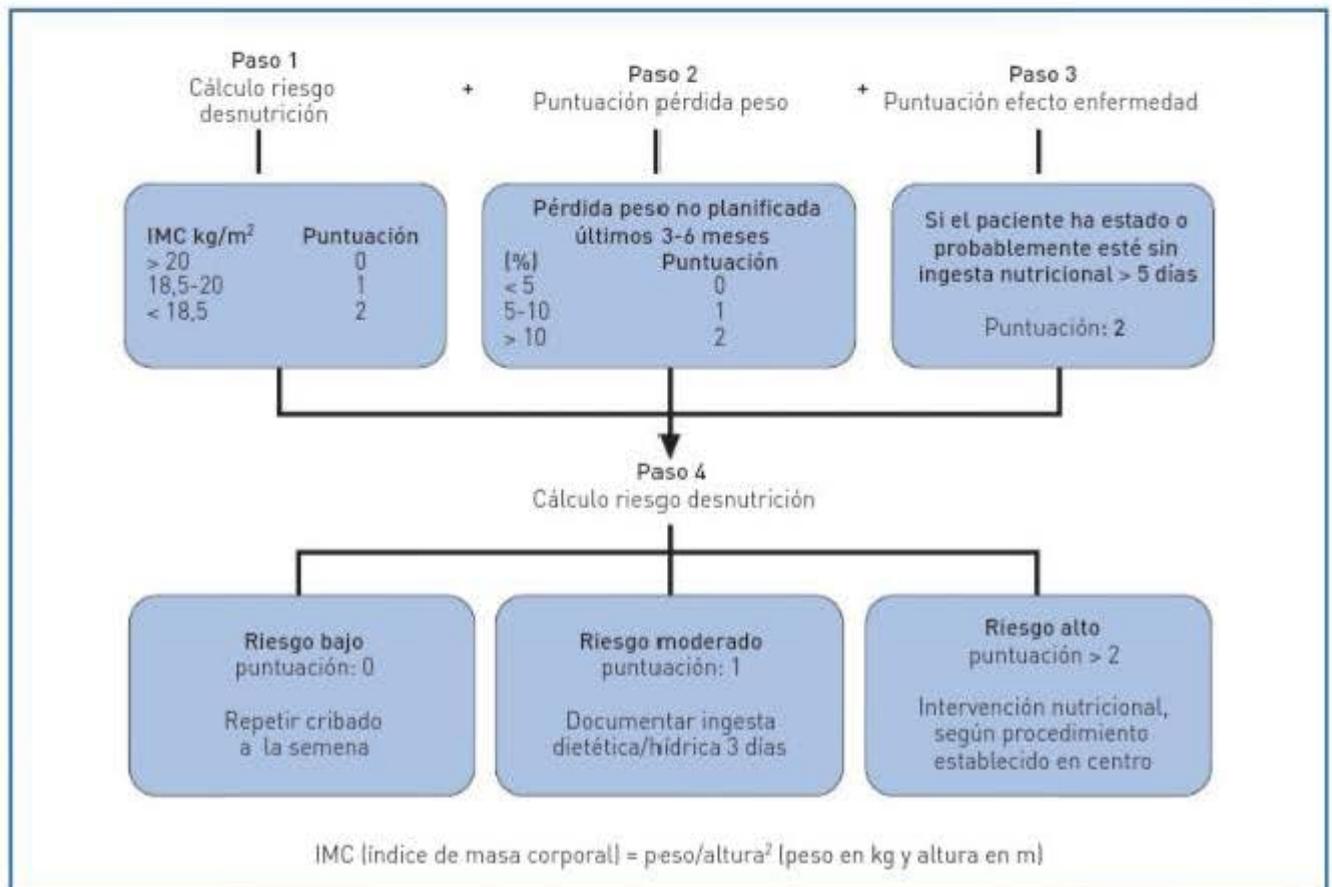


Figura P48-1. Herramienta de cribado nutricional para adultos: *Malnutrition Universal Screening Tool*(MUST).

Tabla P48-1. FACTOR DE CORRECCIÓN O ESTRÉS (AGRESIÓN) SEGÚN NITRÓGENO URINARIO O SITUACIÓN CLÍNICA DEL PACIENTE

Nitrógeno ureico g/24 h*	Grado de estrés	Factor corrección
< 5	No estrés	1,1-1,2
5-10	Estrés leve	1,2-1,3
10-15	Estrés moderado	1,3-1,4
> 15	Estrés severo	1,4-1,5
Enfermedad		Factor corrección
Cirugía menor		1,0-1,2
Cirugía mayor		1,2-1,4
Traumatismos, neoplasias, Ell, pancreatitis		1,3-1,5
Sepsis		1,5

*Nitrógeno ureico/24 h = g; diuresis = mL/día; urea en orina = g/L

$$1.500 \text{ mL} + [20 \times (\text{peso, kg} - 20)]$$

- Algoritmos de decisión (Figs. P48-2 a P48-5).

Protocolo

Determinación del riesgo nutricional

Se evalúa el riesgo nutricional del paciente al ingreso. Para ello se utilizará la herramienta de cribado nutricional MUST (Figura P48-1). Una vez conocido el riesgo nutricional del paciente se determina el nivel de intervención nutricional.

Indicación del SNA

Se determina si en la situación del paciente es aconsejable la realización de un SNA con NE, tanto por estar el paciente en situación de desnutrición como, en el caso de un paciente bien nutrido, que se prevean cambios adversos en su estado nutricional después de una determinada enfermedad o cirugía.

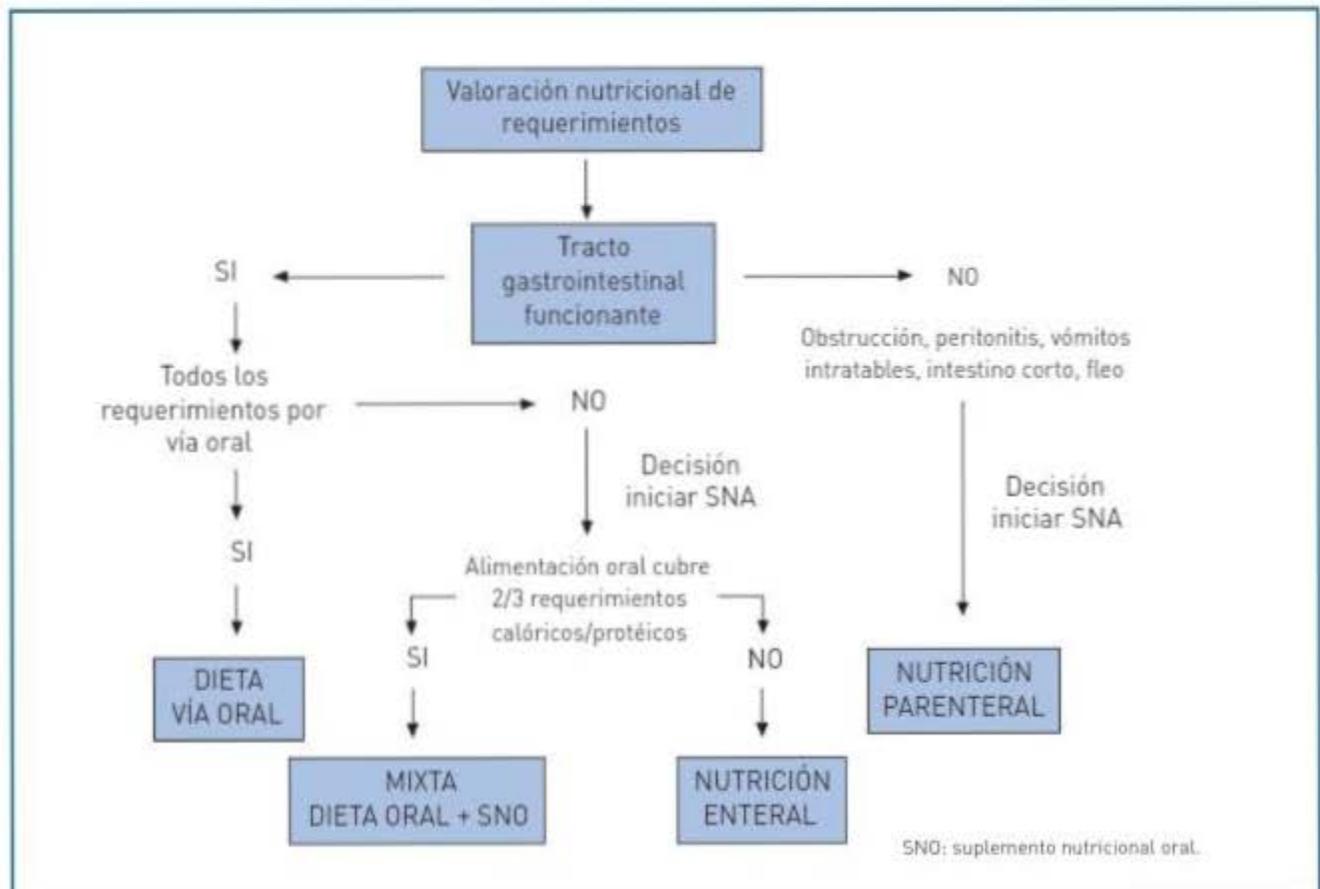


Figura P48-2. Algoritmo aproximación general al soporte nutricional artificial.

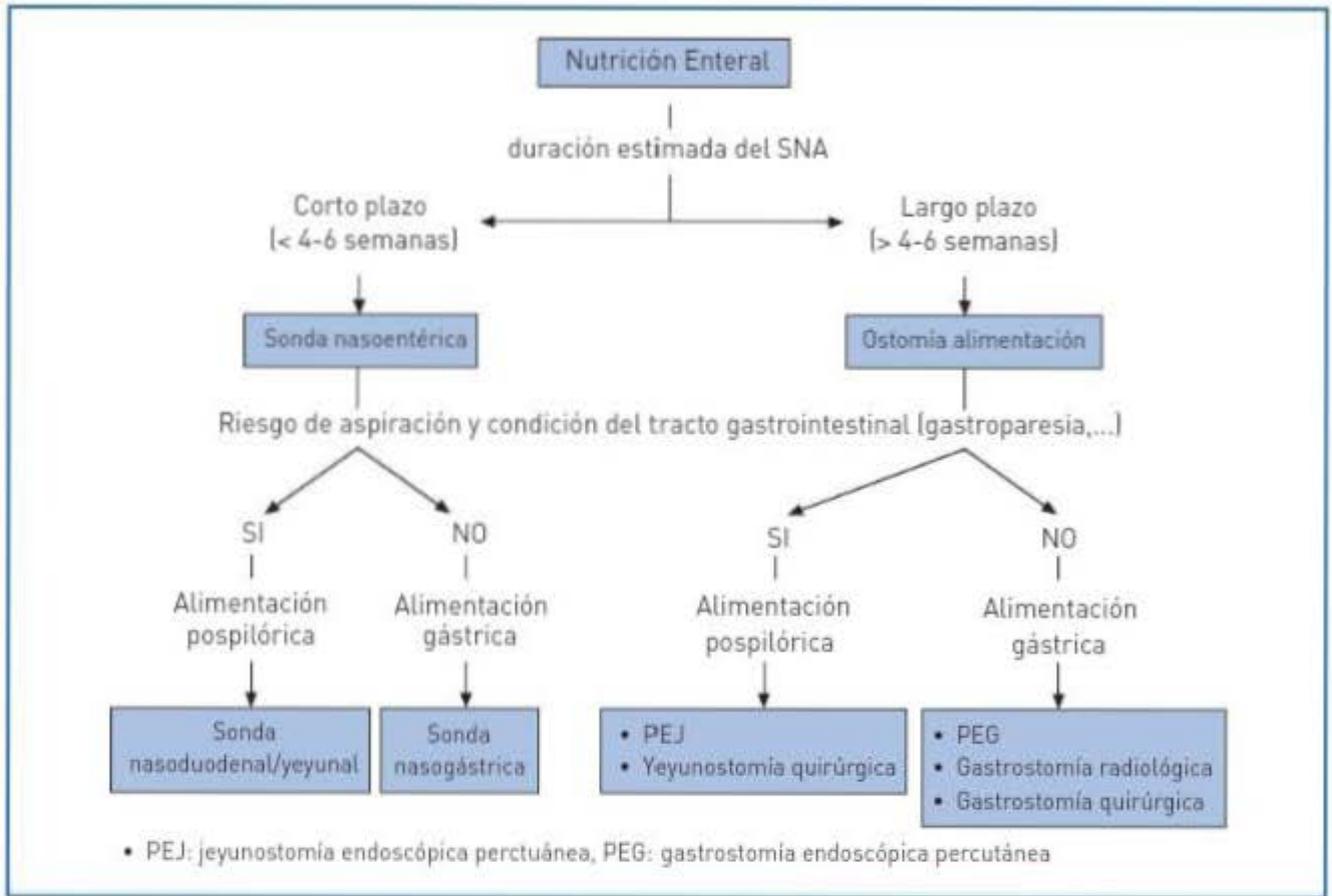


Figura P48-3. Algoritmo de selección de la vía de acceso

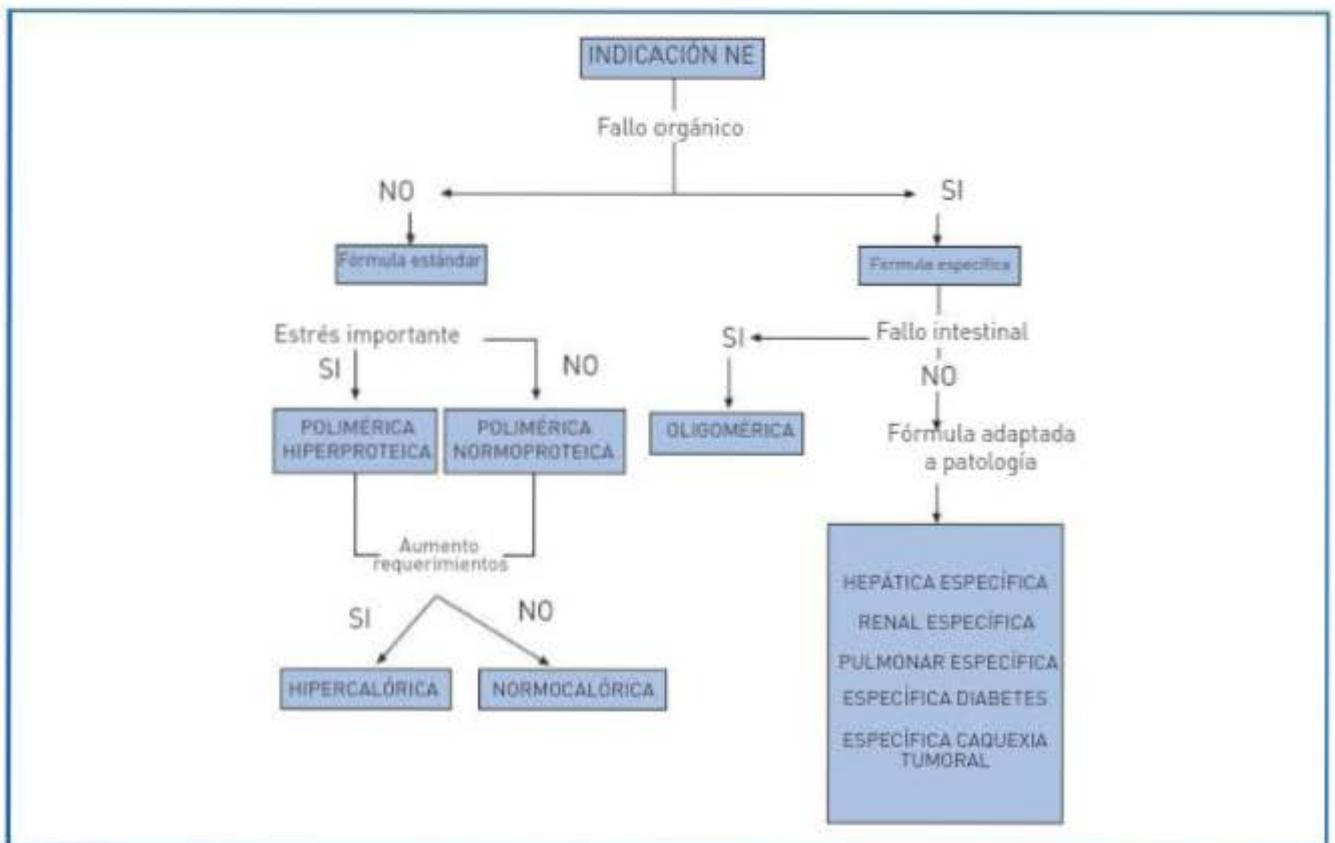


Figura P48-4. Algoritmo de selección de la fórmula de NE

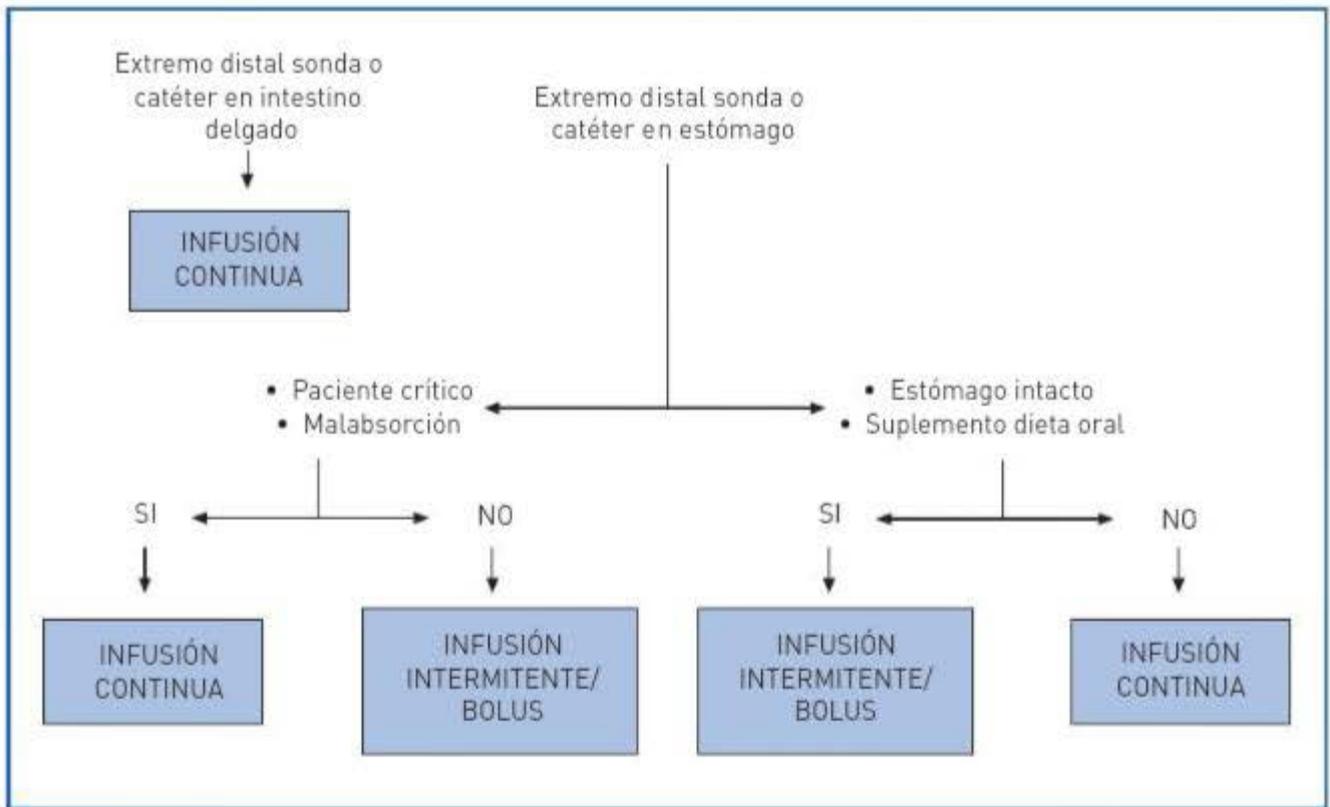


Figura P48-5. Algoritmo selección método administración fórmula NE.

Para la decisión de la indicación de SNA se emplea el algoritmo de la Figura P48-2 y se valoran los siguientes parámetros:

- Porcentaje de peso ideal.
- Cambios experimentados en el peso.
- Cambios en los hábitos nutricionales.
- Niveles de proteínas plasmáticas.
- Condición diagnóstica en relación con la situación nutricional.

El SNA será útil en pacientes que no pueden reunir sus requerimientos nutricionales por vía oral. Así estará indicado en pacientes que lleven sin comer o comiendo poco más de 5 días y/o van a estar sin comer o comiendo poco durante más de 5 días. También en pacientes con capacidad de absorción pobre y/o pérdida importante de nutrientes y/o incremento de las necesidades nutritivas por alto grado de catabolismo. La NE será utilizada, por lo general, con preferencia a la NP. Ésta se usará cuando el tracto gastrointestinal no sea funcional o no se pueda acceder.

Selección de la vía de acceso

Una vez que se ha decidido iniciar una NE, el siguiente paso consiste en seleccionar la vía de acceso. Se tendrá en cuenta la duración prevista del soporte nutricional, la situación clínica del paciente, la enfermedad de base, y el riesgo de aspiración que presente. La elección se llevará a cabo entre los sistemas nasoentéricos o de ostomía de alimentación disponibles y se deberá establecer la localización del extremo distal de la sonda o catéter para alimentación (liberación de la fórmula a nivel gástrico, duodenal o yeyunal). Algoritmo para establecer vía de acceso de la alimentación enteral: Figura P48-3.

Requerimientos calóricos, proteicos e hídricos

El método más exacto para conocer el gasto calórico es la calorimetría indirecta, pero no suele estar disponible en la mayoría de los hospitales. En la práctica clínica se utilizan generalmente

ecuaciones predictivas, como la de Harris-Benedict, con la que se calcula el GEB. Para establecer un soporte nutricional adecuado se suele calcular el gasto energético total (GET) multiplicando el GEB por un factor de corrección o estrés (agresión), dependiente de la situación clínica del paciente (Tabla P48-1).

Si presenta un IMC bajo o dentro de la normalidad se utilizará el peso actual para el cálculo de requerimientos. Para pacientes con un $IMC \geq 30$ kg/m², el peso corporal ajustado puede ser más apropiado para evitar una sobreestimación de requerimientos.

Las necesidades proteicas también se calculan en función del peso del paciente y el grado de estrés metabólico que presente.

Selección de la fórmula de NE

Actualmente hay comercializadas una gran variedad de fórmulas para NE. Esto significa que se dispone de dietas que se adaptan a casi todas las necesidades que se pueden encontrar en la práctica diaria, pero también implica una dificultad importante a la hora de una selección adecuada de la dieta.

Los criterios que se deben tener en cuenta a la hora de seleccionar la dieta son:

Requerimientos calóricos, teniendo en cuenta si lo que se persigue con la dieta es mantener un estado nutricional o realizar una repleción.

- Estado de la función digestiva y de absorción.
- Requerimientos extraordinarios por una enfermedad específica.
- Coste

Algoritmo para la selección de la dieta enteral a emplear: Figura P48-4.

Método y ritmo de administración

Una adecuada tolerancia a la alimentación enteral depende, no sólo de realizar una correcta indicación, sino en gran medida del empleo del método de administración más adecuado. La selección del método de administración tiene gran importancia en el éxito o fracaso a la hora de infundir una dieta enteral, y aún mayor importancia en el caso de los pacientes que se pueden denominar críticos. La localización del extremo distal de la sonda va a ser un factor determinante de las características de la administración, tanto en relación con la fórmula a utilizar como con el ritmo de infusión.

Algoritmo para la elección del ritmo de administración más adecuado: Figura P48-5.

Complicaciones de la NE

Determinar, valorando el estado clínico del paciente y el soporte específico a realizar, las complicaciones debidas a la nutrición que pueden llegar a producirse, principalmente gastrointestinales (residuo gástrico, constipación, diarrea...).

BIBLIOGRAFÍA

- Chen Y, Peterson SJ (2009). Enteral Nutrition Formulas: Which Formulas is right for your adult patient? *Nutr Clin Pract* 24:344-355.
- García de Lorenzo A. (2005). Bases de la Nutrición Artificial. En "Evidencia Científica en Soporte Nutricional Especializado. Conceptos, definiciones y tipos de SNE. Manual de actuación". IM&C, Madrid.
- Lacasa C, Celaya S (2004). Nutrición Artificial. En "Alimentación Hospitalaria. 1. Fundamentos". Martínez JA, Astiasaran I, Muñoz M, Cuervo M. Madrid
- Mesejo A, Carbonell N, Oliva A (2010). Nutrición Enteral. En "Tratado de Nutrición. Tomo IV: Nutrición Clínica". Panamericana, Madrid.
- Stroud M, Duncan H, Nightingale J (2003). Guidelines for enteral feeding in adult hospital patients. *Gut* 52(Suppl VII):vii1-vii12.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Determinación del riesgo nutricional

- Cálculo del nivel de riesgo nutricional según MUST. Nivel de intervención nutricional requerida de acuerdo al resultado obtenido.

Indicación SNA

- Valoración nutricional: bien nutrido/mal nutrido; grado desnutrición.
- Factor de riesgo nutricional: cirugía, enfermedad,...
- Indicado SNA: sí/no; justificación.
- Tipo SNA: NE/NP/mixto; justificación.

Vía de acceso

- Vía de acceso más adecuada: nasoentérica/enterostomía; justificación.
- Situación punta sonda/catéter: estómago/duodeno/yeyuno; justificación.

Requerimientos calóricos, proteicos e hídricos

- GEB, según Harris-Benedict.
- GET, según el grado de estrés y/o enfermedad.
- Necesidades proteicas, según grado de estrés.
- Requerimientos hídricos.

Selección del tipo de fórmula de NE

- Forma del aporte proteico: fórmula polimérica/oligomérica; justificación.
- Contenido proteico de la fórmula: normoproteica/hiperproteica; justificación.
- Densidad calórica (kcal/mL): normocalórica/hipercalórica; justificación.
- Fibra alimentaria: sí/no; soluble/insoluble/mezcla; justificación.
- Dieta específica: sí/no; tipo; justificación.

Método y ritmo de administración

- Tipo de infusión: continua/intermitente/bolus; justificación.
- Control velocidad de administración: gravedad/bomba; justificación.

COMENTARIOS



Confección de dietas: ingestas dietéticas de referencia y tablas de composición de alimentos

M. I. Zubieta Satrústegui, S. Santiago Neri y M. Cuervo Zapatel

INTRODUCCIÓN

La confección de dietas debe presentarse como un proceso dirigido a la elaboración de dietas personalizadas, respetando las recomendaciones dietéticas y nutricionales más actuales, basadas en el aporte suficiente y equilibrado de energía y nutrientes, y dirigido a lograr el buen funcionamiento del organismo, el desarrollo de las actividades diarias, la promoción de la salud y la prevención de enfermedades. Para ello, se hace necesaria una metodología de trabajo ordenada, así como la correcta utilización de diferentes herramientas y materiales de trabajo. En este sentido, las ingestas dietéticas de referencia (IDR) constituyen los valores de referencia de energía y nutrientes que debe contener una dieta para prevenir las enfermedades deficitarias, reducir las enfermedades crónicas y conseguir una salud óptima, aprovechando el potencial máximo de cada nutriente. Por otro lado, las tablas de composición de alimentos (TCA) pueden definirse como recopilaciones de datos sobre la composición nutricional de los principales alimentos consumidos en una determinada zona geográfica. Constituyen una herramienta imprescindible para la evaluación y planificación de dietas (en situación fisiológica/patológica), así como para la evaluación del estado nutricional (si se compara la dieta con ingestas recomendadas de nutrientes), tanto a nivel individual como en colectivos específicos.

OBJETIVO

Los objetivos de la presente práctica son: exponer la sistemática (pasos) para la confección de dietas, describir los métodos de estimación de las

necesidades energéticas y las recomendaciones nutricionales para población española (IDR) y finalmente adquirir destreza en el manejo de tablas de composición de alimentos.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

La confección de una dieta consta de los siguientes pasos:

- 1) Recogida de los datos que caracterizan al individuo a estudio y elaboración de una completa valoración (historia clínica, valoración nutricional, etc.).
- 2) Establecimiento de las necesidades energéticas y nutricionales de manera personalizada (estimación del gasto energético total, necesidades de macronutrientes, micronutrientes, fibra, agua, etc.).
- 3) Determinación de los objetivos, la fórmula nutricional de la dieta y la estrategia dietética a seguir (contenido de la dieta en energía, macronutrientes, micronutrientes, etc.).
- 4) Desarrollo de la pauta dietética de manera individualizada (número de tomas, patrón alimentario, tamaño de las raciones, frecuencia de consumo de los alimentos, recomendaciones dietéticas adicionales, etc.).
- 5) Selección de la TCA, bases de datos de composición de alimentos y fuentes complementarias en función de la información nutricional necesaria y manejo e interpretación correcta de los datos obtenidos.
- 6) Valoración de la adecuación de la dieta confeccionada a las características individuales (cali-

bración, adecuación a las recomendaciones energéticas y nutricionales, a los gustos, preferencias, etc.).

Material

- Métodos de estimación del gasto energético.
- Ingestas dietéticas de referencia (IDR).
- Tablas de composición de alimentos: bibliografía y recursos relacionados.
- Tablas de raciones habituales con pesos y medidas caseras.

Protocolo

El gasto energético total (GET) de una persona se compone de: gasto energético en reposo (GER), gasto energético derivado de la actividad física desmenuada (AF) y termogénesis o efecto termogénico (ET) inducido por distintos factores tales como el mantenimiento de la temperatura corporal o la digestión de los alimentos. Además, en el caso de personas hospitalizadas o con alguna enfermedad, se debe tener en cuenta el gasto derivado del estado patológico (EP) utilizando el factor de agresión correspondiente (Tabla P49-1). De este modo, los componentes principales del gasto energético total (GET) son: $GET = GER + ET + AF (+ EP)$.

La estimación individualizada del GET diario se puede realizar por diferentes métodos, como calorimetría, agua doblemente marcada y ecuaciones basadas en medidas bioquímicas y/o antropométricas

formuladas por diferentes organismos como las recogidas en la propuesta de la Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación, Nutrición y Dietética (FESNAD). Dicha Federación, recomienda la estimación del GET a partir de ecuaciones propuestas por el Comité Americano de Alimentación y Nutrición, del Instituto de Medicina de Estados Unidos (FNB-IOM en sus siglas inglesas *Food and Nutrition Board of the American Institute of Medicine*), para calcular el GET teniendo en cuenta la edad, sexo y estado fisiológico, así como factores de corrección para la actividad física en función de la intensidad y frecuencia de la actividad realizada. Así, una vez estimado el GER, el resultado obtenido se multiplicará por el factor de actividad (F^{AF}) correspondiente: $GET = GER \times F^{AF}$. En personas enfermas además se aplicará el factor de agresión (F^{AG}), es decir: $GET \times F^{AG}$, cuando corresponda.

De esta forma, se distinguen ecuaciones específicas para calcular el GET de niños/as de 0 a 3 años, de niños de 3 a 8 años y niñas de 3 a 8 años (a partir de los 3 años las ecuaciones son diferentes según el sexo), de adolescentes varones y mujeres de 9 a 18 años, de varones y mujeres a partir de los 19 años ya considerados adultos, de adolescentes embarazadas de 14 a 18 años y de 19 a 50 años y de adolescentes lactantes de 14 a 18 años y de 19 a 50 años. En cada uno de estos grupos se tienen en cuenta distintos factores de gasto energético adicional, según corresponda: por formación de nuevos tejidos en organismos en crecimiento, por embarazo o para producción de leche.

En el caso de adultos varones, a partir de los 19 años, el GET es el siguiente:

$$GET = 662 - (9,53 \times \text{edad [a]}) + F^{AF} \times (15,91 \times \text{peso [kg]} + 539,6 \times \text{talla [m]})$$

Y para mujeres adultas, a partir de los 19 años, el GET es el siguiente:

$$GET = 354 - (6,91 \times \text{edad [a]}) + F^{AF} \times (9,36 \times \text{peso [kg]} + 726 \times \text{talla [m]})$$

Donde: [a] es años de edad, [kg] es kilos de peso y [m] metros de talla.

El coeficiente de actividad física (F^{AF}) es el siguiente:

- $F^{AF} = 1,00$ si el nivel de F^{AF} estimado es sedentario
- $F^{AF} = 1,11$ (varones) / $1,12$ (mujeres), si el nivel de F^{AF} estimado es ligero

Tabla P49-1. FACTORES DE AGRESIÓN*

Factores de Barak	Desnutridos: 1,00 Cirugía complicada: 1,25-1,40 Transplante: 1,20 Sepsis: 1,30-1,35 Infecciones: 1,25-1,45 Quemados: 1,60 Tumores sólidos: 1,20 Leucemia/linfoma: 1,25 Enfermedad inflamatoria intestinal: 1,05-1,10 Pancreatitis: 1,10-1,20 Enfermedad hepática: 1,00-1,05
Otros	1,13 por grado de temperatura por encima de los 37 °C

*La aplicación de dichos factores debe realizarse sobre el GET calculado: $GET \times F^{AF}$.
Fuente: Bellido O, de Luis Román D (2006). Manual de nutrición y metabolismo. Díaz de Santos, Madrid.

- $F^{AF} = 1,25$ (varones) / $1,27$ (mujeres), si el nivel de F^{AF} estimado es moderado
- $F^{AF} = 1,48$ (varones) / $1,45$ (mujeres), si el nivel de F^{AF} estimado es intenso

Por otro lado, existen distintos tipos de recomendaciones formuladas por los principales organismos internacionales como son: el FNB-IOM y la Organización Mundial de la Salud (OMS) que, por sus características, relevancia científica y rigor en su elaboración pueden ser de aplicación a nivel internacional. Además, en España se cuenta con las IDR desarrolladas por la FESNAD. Se presentan a continuación en la tabla P49-2 las recomendaciones nutricionales establecidas por la OMS como metas de ingestas de nu-

trientes y alimentos (MINA) para la confección de dietas equilibradas.

Las tablas de composición de alimentos tradicionalmente se han presentado en formato impreso, aunque en la práctica se utilizan informatizadas, es decir en forma de bases de datos de composición de alimentos (BDCA). En la tabla P49-3 se recoge una selección de TCA publicadas, BDCA y otros recursos relacionados. La estructura básica de las TCA incluye:

- Alimentos: tradicionales, importados, marcas comerciales, platos preparados, productos dietéticos, etc.
- Información nutricional en valores que pueden ser: numéricos, traza ("Tr"), cero ("0"), desco-

Tabla P49-2. RECOMENDACIONES NUTRICIONALES PARA ADULTOS SANOS

Parámetro	MINA OMS, 2003 ¹	IDR FESNAD, 2010
Grasa total	15-30%	-
Ácidos grasos saturados (AGS)	< 10%	Lo más baja posible ⁷
Ácidos grasos poliinsaturados (AGP)	6-10%	
Ácidos grasos poliinsaturados omega 6	5-8%	11-17 g/día Ac. linoleico
Ácidos grasos poliinsaturados omega 3	1-2%	1,1-1,6 g/día Ac. α -linolénico
Ácidos grasos trans (AGT)	< 1%	Lo más baja posible
Ácidos grasos monoinsaturados (AGM)	Por diferencia% ²	Por diferencia % ¹
Colesterol	< 300 mg/día	Lo más baja posible ⁷
Hidratos de carbono	55-75% ³	> 130g/día
Azúcares simples	< 10% ⁴	-
Fibra	> 25 g/día	21-38 g/día
Proteína	10-15% ⁵	0,8 g/kg/día
Sal/sodio	< 5 / < 2 g/día ⁶	-

¹ Todas las cantidades expresadas en porcentaje (%) hacen referencia al valor energético total de la dieta.

² La cantidad de AGM que se debe aportar se calcula mediante la siguiente ecuación: AGM = Grasas totales - (AGS + AGP + AGT).

³ La amplitud del margen del aporte de hidratos de carbono es tan extensa debido a que éste se calcula una vez establecidos los objetivos para las grasas y proteínas.

⁴ La OMS los establece con la expresión "azúcares libres" para referirse a todos los monosacáridos y disacáridos añadidos a los alimentos por el fabricante, el cocinero o el consumidor, más los azúcares naturalmente presentes en la miel, jarabes y jugos o zumos de frutas.

⁵ El intervalo se establece en función de la Reunión Consultiva Mixta OMS/FAO/ONU de Expertos de Necesidades en Proteínas y Aminoácidos en la Nutrición Humana, celebrada en Ginebra en 2002.

⁶ La sal debe yodarse en la medida apropiada. Debe reconocerse la necesidad de ajustar la yodación en función de la ingesta de sodio observada y de los resultados de la vigilancia del estado de la población en relación con el yodo.

⁷ Compatible con una dieta variada y equilibrada.

nocidos (“-” o “N”). Si no se especifica lo contrario, los valores corresponden a 100 g netos de alimento crudo, por lo que además suele incluirse el factor de porción comestible.

- Información adicional: manejo, pérdidas o ganancias nutricionales derivadas de la cocción de alimentos, pesos e imágenes raciones, de consumo habitual, listas de alimentos ordenadas según el contenido en determinados nutrientes, etc.

En su manejo hay que tener en cuenta que pueden presentar ciertas limitaciones.

- Incompatibilidades entre las distintas tablas utilizadas en estudios nutricionales multicéntricos.
- Información limitada sobre determinados alimentos, nutrientes específicos ingredientes funcionales o bioactivos.
- Diferentes criterios para la estimación de energía o el contenido de nutrientes.
- Suelen incluir datos prestados de otras tablas, asumidos o copiados de otros alimentos parecidos.
- Variabilidad de la información nutricional debida al propio alimento y al método analítico utilizado.

Algunas orientaciones prácticas para su adecuado manejo son:

- Cuando se utilizan para valorar la ingesta de energía y nutrientes, los resultados deben interpretarse como aproximaciones a la ingesta real, sobre todo si se trata de un solo día. La precisión suele ser menor para los micronutrientes (hierro, sodio, potasio, vitamina C, etc.) y aumenta cuanto mayor sea el número de días valorados.
- En el manejo de los datos, hay que tener en cuenta que los valores desconocidos no deben interpretarse como valores nulos, ya que puede infraestimar la ingesta real. En el caso de los valores traza, es frecuente que se sustituyan por valores nulos o bien se multiplican por un factor corrector (0,5 o 0,71).
- Se elegirán preferentemente TCA/BDCA nacionales. En general, para estudios epidemiológicos suele recomendarse que incluyan al menos 300 alimentos.
- Respecto a las BDCA, son preferibles aquéllas que permitan al usuario añadir nuevos alimentos o modificar valores de la base de datos original.

Tabla P49-3. SELECCIÓN DE TCA, BCDA, PROGRAMAS INFORMÁTICOS DE ANÁLISIS NUTRICIONAL Y OTROS RECURSOS RELACIONADOS*

TABLAS DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS

Moreiras O, y col (2009). La composición de los alimentos (13.ª ed.). Pirámide, Madrid.

Mataix J, y col (2009). Tabla de composición de alimentos españoles (5.ª ed.). Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos. Universidad de Granada.

Russolillo G, y Marques I (2008). Sistema de Intercambios para la Confección de Dietas y Planificación de Menús. ICM.

CESNID. Tablas de composición de alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España (2008). McGrawHill, Barcelona.

Gómez-Cándela C, Loria Kohen V, Lourenço Nogueira T (2008). Guía visual de alimentos y raciones. Editores Médicos, S. A. [EDIMSA].

Ministerio de Sanidad y Consumo (1999). Tablas de composición de alimentos españoles. Madrid.

Bello J y col (1998). Tabla de composición de alimentos cocinados. Díaz de Santos, Madrid.

TCA. Martín Peña G (1997). Nutricia.

BASES DE DATOS DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS

Europa (EuroFIR): http://eurofir.info/eurofir_knowledge/european_databases

España (Red BEDCA): <http://www.bedca.net/>

Internacional (INFOODS): http://www.fao.org/infoods/index_es.stm

Tabla P49-3. SELECCIÓN DE TCA, BCDA, PROGRAMAS INFORMÁTICOS DE ANÁLISIS NUTRICIONAL Y OTROS RECURSOS RELACIONADOS* (cont.)**PROGRAMAS INFORMÁTICOS DE ANÁLISIS NUTRICIONAL**

Easy Diet: http://www.easydiet.es/	MEDISYSTEM español: http://www.sanocare.net
Alimentación y Salud: http://www.ugr.es/~winyta/software.htm	SATN-2009: http://www.club5estrellas.com
DIAL: http://www.alceingenieria.net/nutricion.htm	NUTRIBER: http://www.funiber.org
DIETOWIN: http://www.bl-biologica.es/dietowin.htm	EQUILIBRA: http://www.generalsoftec.com/equilibra.html
DIETPLAN: www.nutrinfo.com.ar/pagina/progs/index.htm	NUTRISOL: http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v23n1/original3.pdf

OTROS RECURSOS

Fichas de alimentos MARM-FEN: http://www.mapa.es/es/ministerio/pags/plataforma_conocimiento/alimentos/practicas.asp
Calculadora nutricional Kellogs: http://www.kellogg.es/nutricion/tablasnutricionales/alimentos.html
Calculadora nutricional SEH: http://www.seh-lelha.org/calena.aspx
Balanza nutricional Dietista Visual: http://www.sanocare.net/dietista-visual.htm
Marco internacional para la descripción de alimentos LANGUAL: http://www.langua.org/langua_literature.asp
Contenido de sustancias potencialmente cancerígenas en los alimentos: http://www.epic-spain.com/libro.html
Base de datos de alimentos alergénicos InformAll: http://foodallergens.ifr.ac.uk/
Replicas de alimentos equivalentes en hidratos de carbono: http://www.bayer.es/ebbsc/cms/es/
Tablas de índice glucémico de alimentos: http://www.nutrinfo.com.ar/pagina/gyt/glycemic.html
Manejo de TCA: http://www.fisterra.com/material/dietetica/manejoTablasAlimentos.asp
Raciones de alimentos Dapcich y col: http://www.ucm.es/info/nutri1/docencia/PiramideRecomendadaSENC2004.pdf
Pesos de raciones y medidas caseras SENC-SemFYC: http://www.semfy.com/pfw_files/cma/Informacion/modulo/documentos/guia_alimentacion.pdf
Láminas sobre distorsión de porciones: http://www.nutriactive.net/index.php?_a=viewProd&productId=256

* TCA: tablas de composición de alimentos. BCDA: bases de datos de composición de alimentos

BIBLIOGRAFÍA

- Bellido D, De Luis Román D (2006). Manual de nutrición y metabolismo. Díaz de Santos. Madrid.
- FAO/OMS (2003). Consulta Mixta de Expertos FAO/OMS en Régimen Alimentario, Nutrición y Prevención de Enfermedades Crónicas. Dieta, Nutrición y Prevención de Enfermedades Crónicas. OMS, Ginebra.
- Cuervo M, Abete I, Baladía E, Corbalán M, Manera M, Basulto J, Martínez JA (2010). Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para la población española. Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD). Eunsa, Pamplona.
- Church SM (2009). Review EuroFIR Synthesis report No 7: Food composition explained. http://www.eurofir.net/sites/default/files/EuroFIR_Synthesis_Report_No_7_Food_Composition_Explained.pdf (último acceso, abril-2010).
- SENC-SemFYC (2007). Consejos para una Alimentación Saludable. http://www.semfy.com/pfw_files/cma/Informacion/modulo/documentos/guia_alimentacion.pdf (último acceso, abril-2010).

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

*Análisis nutricional de la dieta*

Alimento	Peso (g)	Calorías	Proteína (g)	Hidratos de carbono (g)	Lípidos (g)	Colesterol (mg)	Fibra (g)	Vitaminas			Minerales			
Totales	-													
% VET	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	-

VET: valor energético total

COMENTARIOS



Programa informático para la valoración del estado nutricional y la confección de dietas

M. Cuervo Zapatel, L. García de Diego, J. A. Moreno Rello y J. A. Martínez Hernández

INTRODUCCIÓN

La aplicación de la informática en el campo de la nutrición y la dietética es de gran importancia, tanto en consulta, como en investigación e incluso en educación, ya que permite realizar el seguimiento de multitud de pacientes para llevar un mejor y más rápido control de cada uno de ellos, ofreciendo la posibilidad de diseñar dietas adecuadas a cada individuo o grupos de población. Por otro lado, en el campo de la nutrición y la salud, existe bastante información sobre composición de alimentos, ingestas dietéticas de referencia, recomendaciones nutricionales dirigidas a diferentes patologías y una gran variedad de cuestionarios que recogen mucha información sobre el diagnóstico de diferentes patologías, gasto energético, calidad de vida o el estado nutricional del paciente.

En este sentido, los programas informáticos, en general, permiten realizar una rápida valoración del estado nutricional de cada individuo, a partir de la información recogida en la consulta dietética, ya que son capaces de aplicar fórmulas con rapidez, comparar los resultados con los valores de referencia correspondientes y realizar así la interpretación de cada uno de los parámetros analizados. Asimismo, ofrecen la posibilidad de conocer la ingesta de energía y nutrientes que presenta cada persona, a través de la alimentación, en el momento de la consulta y confeccionar dietas adaptadas a sus necesidades particulares. La valoración del estado nutricional engloba datos antropométricos, bioquímicos, clínicos, inmunológicos, dietéticos, etc., ya que no existe un criterio único que describa de forma objetiva la salud óptima. Las conclusiones que se al-

canzan a través de la evaluación del estado nutricional constituyen la base para el asesoramiento dietético.

OBJETIVO

Valorar el estado nutricional, así como estimar y confeccionar dietas utilizando un ordenador personal.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Para valorar el estado nutricional de un individuo es necesario conocer una información básica que incluye aspectos psicosociales, antropometría y composición corporal, historia clínica, evaluación bioquímica e historia dietética.

Material

El programa informático que se presenta para desarrollar esta práctica ha sido elaborado bajo un sistema operativo Windows®. Para su programación se ha usado la aplicación Netbeans IDE 6.8 y funciona para cualquier sistema operativo.

Protocolo

Datos personales: con objeto de dar de alta al paciente, se crea su ficha anotando la información individual disponible (nombre, dirección, telé-

fono, email, fecha de nacimiento, etc.). Dentro de este apartado existen:

1. "Visitas": recoge la historia de cada paciente, que incluye número y fecha de todas las consultas que ha realizado hasta el momento, las cuales pueden ser copiadas y/o modificadas. También se encuentran los "gráficos de evolución" de algunos parámetros importantes en la valoración del estado nutricional: peso, índice de masa corporal (IMC), colesterol, glucosa, etc., que permiten analizar su evolución a lo largo del tiempo. Al finalizar la evaluación del estado nutricional del individuo, existe la posibilidad de confeccionar un informe e imprimirlo. Se puede acceder a este informe mediante el icono "informe" que aparece dentro de esta pestaña. En este informe se incluye un resumen de toda la información recogida en consulta y la obtenida al completar el estudio nutricional del individuo con el programa informático.
2. "Aspectos psicosociales": recoge información general del paciente, aspectos sobre su ocupación, situación social, religión o etnia, la auto-percepción de su estado de salud, hábitos nutricionales, consumo de tabaco y alcohol, actividad física, hábitos de descanso y su tolerancia al estrés, entre otros (Fig. P50-1).

Antropometría y composición corporal: en este apartado se recogen los datos antropométricos (peso, talla, pliegues cutáneos y perímetros corporales) disponibles de cada individuo y el programa los compara con los estándares de referencia establecidos en cada caso, interpretándolos desde un punto de vista nutricional. La figura P50-2 recoge un ejemplo con una paciente bebé de 3 meses de edad.

1. El cálculo del "peso deseable" se realiza mediante tablas tabuladas como las de Alastrué o mediante ecuaciones como la de *Metropolitan Life Insurance*, Lorenz o la Brocca. Además, el programa nos informa del porcentaje de peso deseable y su índice nutricional.
2. Para conocer la "complexión del individuo" será necesario introducir el perímetro de la muñeca o la envergadura del codo en centímetros.
3. Por otro lado, el programa calcula diferentes "índices nutricionales" mediante comparación de distintos parámetros antropométricos con sus estándares de referencia o curvas percentiladas establecidos para los distintos grupos de población, en función de la edad y sexo.

Composición corporal: una vez introducidos los datos necesarios el programa calcula los distintos compartimientos corporales: masa grasa,

Figura P50-1. Imagen de la información psicosocial.



Figura P50-2. Imagen de Antropometría en la Infancia (0 a 2 años).

masa magra y agua total, utilizando diferentes ecuaciones: Siri, Brozek, Deurenberg, Lean, Hume and Weyers y Walson, y presenta los resultados de forma gráfica. El programa ofrece también la posibilidad de introducir manualmente el porcentaje de masa grasa corporal calculado por DEXA, impedancia bioeléctrica y/o BOD-POD.

Historia clínica: recoge información relacionada con la situación clínica actual del paciente, además de obtener una retrospectiva del individuo determinando los elementos familiares, personales y farmacológicos relacionados con su enfermedad. Para ello se dispone de los siguientes apartados:

1. "Antecedentes clínicos": en donde se recogen los antecedentes familiares y personales relacionados con enfermedades que se asocian con la nutrición.
2. En "Anamnesis por aparatos y sistemas" se registran todas las enfermedades que padece el paciente, ordenadas por aparatos y sistemas. En "enfermedad actual" se describe la situación fisiopatológica actual, incluyendo el tiempo de evolución, así como los posibles desencadenantes y el tratamiento recibido.
3. "Farmacología" engloba:
 - "Tratamientos farmacológicos que afectan a la nutrición": en donde se recogen los diferentes fármacos que pueden interferir con el estado nutricional, bien porque se produce una menor captación de nutrientes, por

que se incrementa el apetito o porque aumentan los niveles de ciertos nutrientes en plasma.

- "Fármacos afectados por la nutrición": donde se encuentran los alimentos que pueden interferir con el metabolismo de diferentes fármacos.
 - "Fármacos para el tratamiento de la obesidad": que incluyen los tratamientos farmacológicos correspondientes.
4. "Exploración física": recoge los signos y síntomas físicos que aparecen en los individuos con alguna alteración nutricional. Dependiendo del tipo de alteración existen tres subapartados: "signos y síntomas de posible deficiencia nutricional", "signos y síntomas del posible exceso nutricional" y "signos clínicos de las alergias nutricionales", cada uno de los cuales está apoyado con imágenes para definir mejor las alteraciones nutricionales.
 5. "Cuestionarios de diagnóstico": donde se realizan cuestiones específicas orientadas a detectar situaciones de deterioro cognitivo, trastornos de personalidad, ansiedad, insomnio, autoestima, etc. Entre ellos destacan los "cuestionarios relacionados con trastornos del comportamiento alimentario" que permiten realizar un prediagnóstico de enfermedades como la anorexia o la bulimia nerviosas. Cuando se completa alguno de estos cuestionarios el programa proporciona un *score* que clasifica al individuo en los diferentes niveles de afectación.

Análisis bioquímico: en este apartado se introducen los resultados de las “determinaciones en sangre”, “determinaciones en orina” y “pruebas inmunológicas”. Conforme se introducen los datos, el programa los interpreta al compararlos con los valores de referencia adecuados en cada caso.

Historia dietética: recoge información sobre el consumo de alimentos, hábitos dietéticos, frecuencias, preferencias y/o aversiones alimentarias. Se subdivide en los siguientes apartados:

1. “Recordatorios/diarios dietéticos”: en donde existen distintas opciones a cumplimentar: “historia dietética corta”, “recuerdo/diario 24 horas”, “recuerdo/diario 72 horas” y “recuerdo diario semanal”. En todos ellos, se recoge información acerca de los alimentos y bebidas consumidas a partir de un listado que ofrece el programa. Simultáneamente se calcula la cantidad consumida de los principales nutrientes y la capacidad antioxidante de la dieta, además de realizar un gráfico con la distribución de energía en proteínas, hidratos de carbono, lípidos y etanol. Toda esta información se presenta de forma más detallada en el apartado “resultados”, que recoge también las recomendaciones nutricionales del individuo estudiado. En “cuestionarios de frecuencia” también existe la posibilidad de escoger entre varios modelos: “cuestionarios cualitativos”, “cuestionarios semicuantitativos” o “cuestionarios cuantitativos”.
2. “Escala visual análoga”: la cual consta de cinco cuestiones que valoran el grado de apetito o saciedad mediante una escala de 10 cm, donde se considera en un extremo la intensidad mínima y en el otro extremo la máxima, así el paciente señala el punto que mejor describa su sensación de apetito o saciedad.
3. “Índices de alimentación saludable”: recoge diferentes cuestionarios que incluyen informa-

ción sobre la dieta del individuo, para que el programa calcule un *score* que informa sobre la calidad de la dieta.

Pronóstico nutricional: donde se recogen los siguientes subapartados (Fig. P50-3):

1. “Índice pronóstico”: agrupa cuatro índices nutricionales los cuales, mediante ecuaciones multivariadas, valoran el riesgo de presentar complicaciones ligadas a la malnutrición. Para que el programa realice el cálculo, deben haberse introducido parámetros como: albúmina, prealbúmina, transferrina, linfocitos totales, respuesta alérgica, pliegue tricipital, peso actual, peso habitual, peso deseable y altura.
2. “Tipos de desnutrición”: ofrece la posibilidad de clasificar la desnutrición en “desnutrición proteica” o “desnutrición calórica”. Para ello es necesario entrar dentro de cada apartado y el programa dirá si existe o no ese tipo de desnutrición, siempre que se hayan introducido previamente los parámetros necesarios. Si no fuera así, el programa da la oportunidad de introducirlos en este momento. En el caso de que ambas desnutriciones dieran positivas estaríamos ante un caso de desnutrición mixta. En este apartado también se encuentra el “protocolo diagnóstico de Chang”, que permite conocer el tipo de desnutrición en base a un sistema de puntos obtenidos en los parámetros antropométricos y en los valores bioquímicos e inmunológicos.
3. En “Escala rápida de valoración” existe una batería de cuestionarios rápidos y sencillos que sirven para identificar aquellos pacientes con riesgo o en situación de desnutrición, en base a un *score* que se relaciona directamente con el estado nutricional.
4. “Pronóstico síndrome metabólico”: recoge cuatro opciones que se correlacionan con cuatro criterios de diagnóstico de síndrome meta-

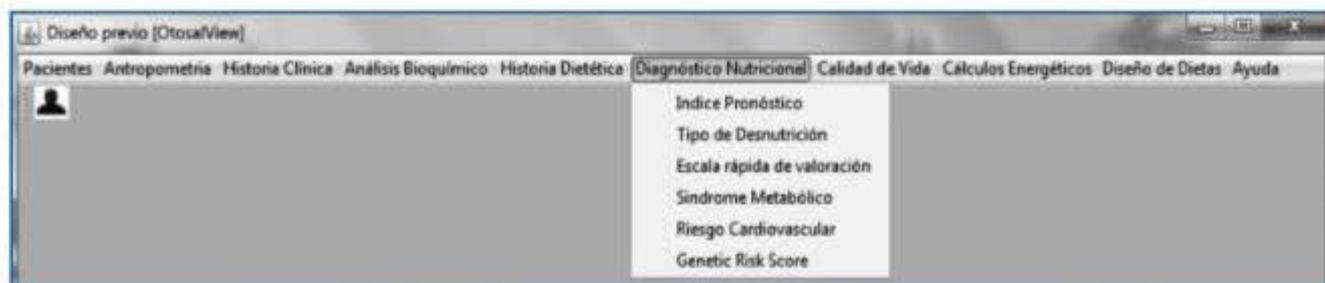


Figura P50-3. Imagen de los apartados de Pronóstico Nutricional.

bólico. Una vez completados todos los parámetros el programa calcula el diagnóstico según cada criterio.

5. En "Pronóstico riesgo cardiovascular" aparecen tres posibilidades para valorar el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Para el caso "Framingham" y "Dorica" hay un listado de parámetros en base a los cuales el programa calcula un *score* que valora el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares en los próximos 10 años. En el caso de "NCEP ATP III" el programa nos informa si es necesario poner en tratamiento a la persona para prevenir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.
6. El "genetic risk score" permite calcular el riesgo genético de padecer una enfermedad. El programa permite calcular el riesgo genético para la "obesidad", la "diabetes tipo II" y los "infartos coronarios". Dentro de cada pestaña aparece un listado de SNP (*Single-Nucleotide Polymorphisms*) que contribuyen de forma proporcional al riesgo de padecer cada una de las enfermedades, se seleccionan aquellos SNP que porta el individuo y el programa ofrece un *score* que está directamente relacionado con el riesgo de padecer la enfermedad.

Calidad de vida: en este apartado existe un listado de cuestionarios que evalúan la calidad de vida relacionada con la salud del individuo. Como existen cuestionarios específicos para distintas patologías, primero se selecciona la información que se desea obtener: "medidas de incapacidad funcional", "medidas de bienestar psicológico y salud mental", "medidas de salud social", "medidas de dolor", "medidas genéricas de calidad de vida relacionadas con la salud" y "medidas específicas de calidad de vida relacionadas con la salud". Dentro de cada apartado se encuentran los cuestionarios relacionados con cada medida específica, y el programa informa del impacto de la enfermedad en el individuo, en base al *score* obtenido en cada caso.

Cálculos energéticos: se recoge la información sobre el gasto energético diario del individuo de acuerdo con la actividad profesional y física que tenga y se encuentra dividido en:

1. "Cálculos energéticos basales": donde el programa calcula el metabolismo basal mediante diferentes métodos.
2. "Cálculos energéticos totales": a partir de aquí se accede a una pantalla con diferentes opcio-

nes de cálculo en función de la edad: para menores de 18 años, embarazadas y lactantes la FAO (2001) ha diseñado ecuaciones empíricas que calculan el coste energético independientemente de su grado de actividad. A partir de 18 años se puede elegir entre "requerimientos energéticos generales" donde el gasto energético total se calcula eligiendo el nivel general de actividad de entre seis posibilidades, o "requerimientos energéticos según oficio" donde la actividad diaria aparece desglosada en el número de horas que se dedica a cada tipo de actividad hasta completar un total de 24 horas.

3. "Cálculo de METs": recoge un recordatorio de 72 horas de actividad física donde se puede escoger entre dos formas de análisis: seleccionando la energía gastada entre los nueve bloques que ofrece el programa o escogiendo directamente la actividad realizada de un desplegable; en ambos casos el programa calculará los equivalentes metabólicos (MET)/24 horas.
4. "Cuestionarios de actividad física": recoge diferentes cuestionarios para medir el grado de actividad física o los MET-minuto/semana o las kcal totales/semana, dependiendo del cuestionario seleccionado. Dentro de este apartado se encuentran los "cuestionarios de actividad física asociados a proyectos" en donde aparecen diferentes cuestionarios de actividad física que han sido utilizados en diferentes estudios poblacionales.
5. "Cuestionarios de aptitud física": ofrece la posibilidad de medir las funciones (esqueleto-muscular, cardio-respiratoria, psiconeuronal, etc.) y estructuras que intervienen en el rendimiento de la actividad física y/o ejercicio físico.

Diseño de dietas: donde se realiza un análisis de la ingesta y se compara con las ingestas dietéticas de referencia para la población española (IDR). Además se puede confeccionar la dieta más adecuada a las características del individuo. Dentro del apartado "grupo de alimentos" existe un listado de alimentos divididos en grupos generales de alimentos, que se van desplegando hasta encontrar el listado total. Cada uno de estos alimentos puede ser seleccionado mostrando su ración típica, si se dispone de ella, o cambiando dicha cantidad por otra bruta o neta. De este modo, se van incluyendo todos los alimentos que componen la dieta dentro de la toma del día que corresponda (desayuno, almuerzo,

comida, merienda, cena o recena). El programa permite realizar dietas de hasta 15 días. Dentro de “calibración detallada” se visualiza la cantidad de energía y nutrientes ingeridos por día, pudiendo ser comparados con las IDR del individuo estudiado. Esta información también aparece representada gráficamente. El programa ofrece además la posibilidad de acceder a dos nuevos apartados:

1. “Intercambio”: permite intercambiar los alimentos seleccionados con otros equivalentes.
2. “Dietas modelo”: ofrece ejemplos de dietas para diferentes patologías y con diferentes aportes calóricos, como orientación en la confección de dietas adecuadas a circunstancias específicas.

BIBLIOGRAFÍA

Badía X, Alonso J (2007). La medida de la salud. Tecnología y Ediciones del Conocimiento (EDITEC). Fundación Lilly, Barcelona.

Cuervo M, Abete I, Baladía E, Corbalán M, Manera M, Basulto J, Martínez JA (2010). Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para la población española. FESNAD. Eunsa, Pamplona.

Gibson RS (2005). Principles of Nutritional Assessment. 2nd edition. Oxford University Press, New York.

Martínez JA (1992). Compendio de Nutrición y Dietética. Eurograf, Pamplona.

McLaren DS (1992). A colours atlas and text of diet-related disorders. En “Nutritional disorders”. Wolfe Medical Press, Oxford.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Este programa permite realizar una valoración completa del estado nutricional de un individuo y ofrece la posibilidad de estimar y confeccionar la dieta más adecuada de forma rápida y fiable. El programa es muy fácil de utilizar, emplea cuestionarios y gráficos para una mejor interpretación de los resultados y permite obtener un informe impreso con los datos de cada persona (Fig. P50-4).

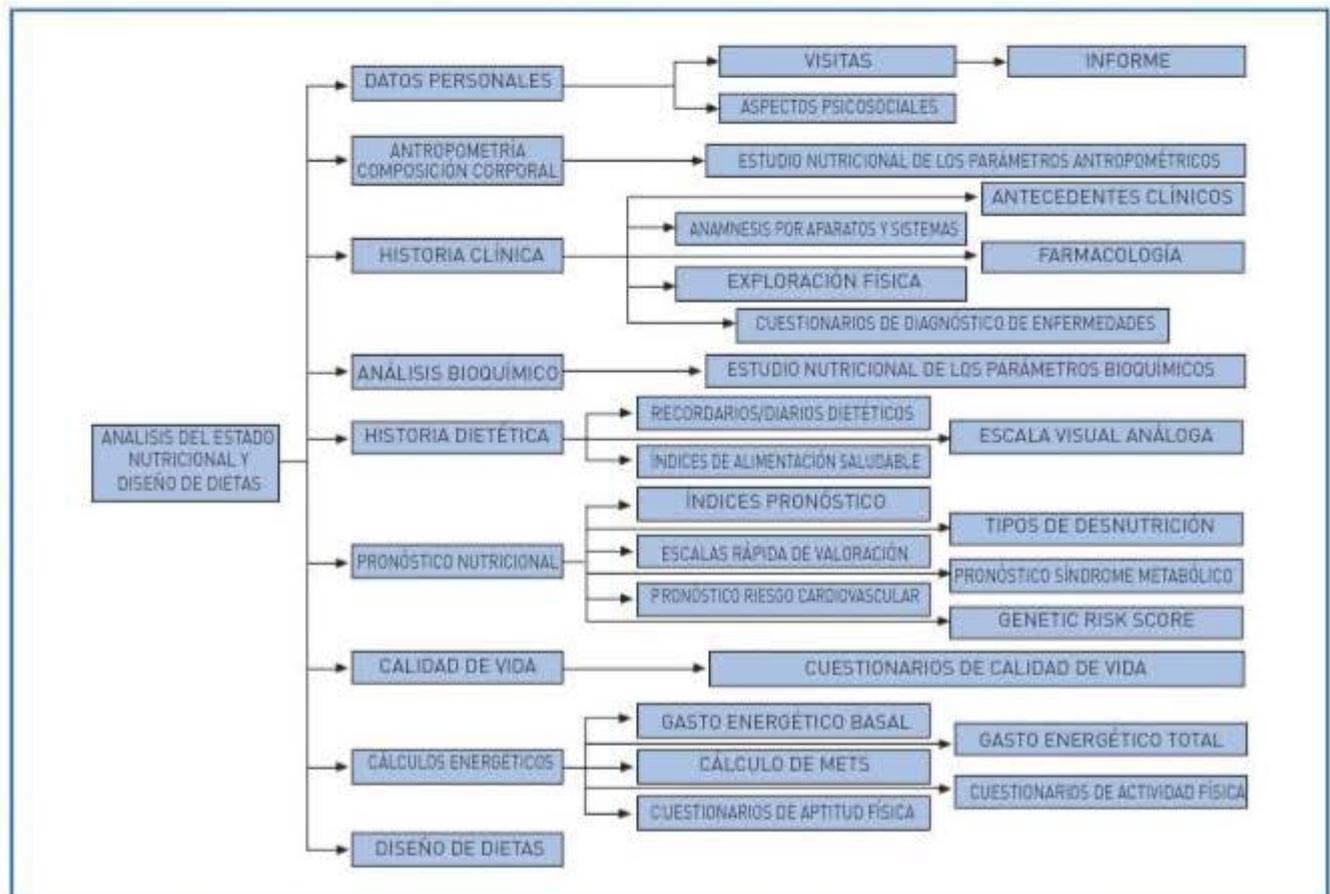


Figura P50-4. Esquema del programa.



COMENTARIOS

A large, empty light blue rectangular area intended for writing comments or notes.

Preparación de una dieta de adelgazamiento en una situación de sobrepeso

S. Navas-Carretero, G. Russolillo Femenías y J. A. Martínez Hernández

INTRODUCCIÓN

Una dieta equilibrada debe aportar los nutrientes necesarios para cubrir las demandas fisiológicas en cada momento del ciclo vital, de forma que se mantenga un estado óptimo de salud y se pueda prevenir la aparición de enfermedades. En determinadas circunstancias, un régimen dietético puede buscar un determinado beneficio terapéutico a través de la modificación del aporte de nutrientes específicos (fenil alanina en la fenilcetonuria, lactosa en casos de alactasia, fibra en procesos que cursen con diarrea, control del aporte de grasas en situaciones de hipercolesterolemia, etc.).

El tratamiento de la obesidad puede basarse en el aumento de la actividad física, la prescripción de fármacos, la cirugía, etc., pero el tratamiento basado en dietas hipocalóricas suele ser el de primera elección. La distribución de los macronutrientes (proteínas e hidratos de carbono fundamentalmente) y la presencia de fibra son elementos que pueden afectar favorablemente en algunos casos, a una mayor pérdida de peso dentro de una dieta baja en calorías, ya que pueden contribuir al efecto termogénico de la dieta, la saciedad, la homeostasis lipídica, etcétera.

En este contexto, la bibliografía científica aporta información sobre diferentes tipos de dietas, como las moderadamente hiperproteicas con control del tipo de lípidos (altas en omega-3 y reducidas en saturados y trans) y un aporte de hidratos de carbono de bajo índice glucémico, con beneficios adicionales dentro de una misma restricción calórica. En todo caso, estas dietas deben ser hipocalóricas, englobar a todos los nutrientes, personalizadas, variadas en alimentos y de un seguimiento o adherencia fácil.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica consiste en elaborar una dieta moderadamente hiperproteica con una distribución 30:40:30 respecto al porcentaje de energía proveniente de proteínas (30%), hidratos de carbono (40%) y grasas (30%) respectivamente, y con un contenido adecuado de todos los demás nutrientes.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

La base de una dieta dirigida a perder peso estará fundamentada en la restricción calórica respecto a las demandas energéticas incrementadas. En ese sentido, la prescripción de una dieta baja en calorías debe estar enfocada inicialmente a la estimación de la situación ponderal o de exceso de peso del individuo obeso, a través de tablas o del índice de masa corporal ($IMC > 27,5 \text{ kg/m}^2$). A continuación, deben establecerse los requerimientos energéticos, utilizando medidas directas (calorimetría) o mediante ecuaciones de gasto energético considerando la situación general, es decir, su metabolismo basal, la actividad física y el efecto termogénico de los alimentos.

La restricción energética típica suele basarse en un 30% menos del gasto energético o una restricción de 500-600 kcal sobre el nivel de necesidades estimado. En ocasiones se han prescrito dietas muy bajas en calorías (VLCD) de 800 a 1.200 kcal, cuando existe un estricto control facultativo.

La tercera etapa consiste en la confección de una dieta variada, personalizada a gustos indivi-

duales basados en los intercambios y seleccionada en función del nivel calórico a prescribir. Un intercambio es la cantidad de un grupo de alimentos que aporta una cantidad fijada de energía, aunque con un peso/masa diferente (Tabla P51-1). Algunos ejemplos vienen expresados en las tablas P51-2 a P51-20. La asignación del nivel calórico viene definido por la tabla P51-21.

Protocolo

Un modelo de actuación puede basarse en la preparación de una dieta para una mujer de 50 años, 160 cm de altura, 75 kg de peso y un nivel de actividad física muy leve. En primer lugar, habría que calcular sus requisitos energéticos en función de las fórmulas de Harris-Benedict:

$$\text{Mujeres: GER} = 655 + (9,56 \times P) + (1,85 \times T) - (4,68 \times E)$$

$$\text{Hombres: GER} = 66,5 + (13,75 \times P) + (5,0 \times T) - (6,78 \times E)$$

Donde:

GER = Gasto Energético en Reposo

P = peso en kg

T = talla en cm

E = edad en años

Una vez estimado el gasto basal, hay que añadir el gasto en función de la estimación de la

actividad física y aplicar el factor de actividad correspondiente. Así la estimación del nivel general de actividad se puede realizar en base a la siguiente escala:

- **Actividad muy leve:** actividades en posición sentada y de pie, oficinistas, abogados, médicos, estudiantes, dependientes de comercio, maestros, jubilados, parados, pintores, trabajos de laboratorio, secretarías, amas de casa (planchar, cocinar, etc.), músicos y profesores similares.
- **Actividad leve:** actividades como caminar o pasear, deportes como el golf y tenis de mesa, electricistas, obreros de la construcción, trabajadores de la industria ligera, personas del campo, pescadores, soldados en servicio activo, carpinteros, limpiezas de oficinas o de hogar, trabajos en hostelería y restauración y profesiones similares.
- **Actividad moderada:** actividades como practicar footing, ciclismo, tenis, esquiar, bailar, trabajadores forestales, mineros, trabajadores en la industria pesada y metalurgia, trabajos no especializados (p. ej., mozo de carga y descarga), deportistas en general.
- **Actividad excepcionalmente intensa:** leñadores, herreros, algunos deportes como escalada, baloncesto, fútbol americano, hockey y deportes pesados en general.

Según el grado de actividad física del paciente se multiplicará el GER por el factor de actividad física:

Tabla P51-1. VALOR CALÓRICO DE DISTINTOS ALIMENTOS		
Alimento	Valor calórico	Raciones
Lácteos	152 kcal	30-240 g
Verduras	28 kcal	50-100 g
Frutas	64 kcal	75-250 g
Azúcares	40 kcal	10-40 g
Féculas	72,5 kcal	15-100 g
Alimentos proteicos	37 kcal	30-40 g
Grasas	45 kcal	5-15 g

Nivel general de actividad	Factor de actividad (\times GER)	Gasto de energía (kcal/kg de peso/día)
Reposo, descanso, cama	1,2	
Muy leve		
Hombres	1,3	31
Mujeres	1,3	30
Leve		
Hombres	1,6	38
Mujeres	1,5	35
Moderado		
Hombres	1,7	41
Mujeres	1,6	37
Intenso		
Hombres	2,1	50
Mujeres	1,9	44
Excepcionalmente intenso		
Hombres	2,4	58
Mujeres	2,2	51

Tabla P51-2. LISTAS DE INTERCAMBIO DE ALIMENTOS LÁCTEOS ENTEROS
(152 kcal, 12 g CH, 8 g proteínas, 8 g de lípidos)

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
Cuajada	1 unidad	150
Leche entera	1 tazón	240
Yogur natural entero	2 unidades	250

Tabla P51-3. LISTAS DE INTERCAMBIO DE ALIMENTOS LÁCTEOS SEMIDESNATADOS
(116 kcal, 12 g CH, 8 g proteínas, 4 g de lípidos)

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
Leche semidesnatada	1 tazón	240

Tabla P51-4. LISTAS DE INTERCAMBIO DE ALIMENTOS LÁCTEOS DESNATADOS
(89 kcal, 12 g CH, 8 g proteínas, 1 g de lípidos)

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
Leche desnatada	1 tazón	240
Yogur desnatado	2 unidades	250

Posteriormente se aplica la restricción del 30% de las necesidades energéticas, con lo que se consigue una dieta de 1.100-1.200 kcal/día, de las cuales un 30% las aportarán las proteínas, un 40% serán aportadas por hidratos de carbono de baja carga glucémica y el 30% restante provendrá de lípidos, principalmente de ácidos grasos mono y poliinsaturados, intentando que el aporte de ácidos grasos omega-3 sea elevado.

La distribución por grupos de alimentos de una dieta hiperproteica con distribución 30:40:30 podría corresponder a 0,5 intercambios de lácteos enteros, 2 intercambios de verduras, 1 intercambio de fruta, 6 intercambios de féculas, 4 intercambios de grasas, 6,5 intercambios de alimentos proteicos del grupo I y finalmente 3 intercambios de alimentos proteicos del grupo II.

El punto limitante para el cálculo de los intercambios necesarios para una dieta hipocalórica es el correcto cálculo de las necesidades energéticas del paciente, pero también se debe considerar una distribución de macronutrientes adecuada, en nuestro caso con un contenido moderadamente elevado de

proteínas y con alto aporte de ácidos grasos omega-3. Como se puede observar en las tablas P51-12 a P51-15, dentro de los grupos I y II de alimentos proteicos encontramos moluscos, carnes magras y pescados grasos, característicos por su bajo contenido en grasas saturadas y en el caso de pescados grasos ser ricos en ácidos grasos omega-3.

BIBLIOGRAFÍA

- Abete I, Astrup A, Martínez JA, Thorsdottir I, Zulet MA (2010). Obesity and the metabolic syndrome: role of different dietary macronutrient distribution patterns and specific nutritional components on weight loss and maintenance. *Nutr Rev* 68:214-31.
- Abete I, Parra D, Martínez JA (2009). Legume-, fish-, or high-protein-based hypocaloric diets: effects on weight loss and mitochondrial oxidation in obese men. *J Med Food* 12:100-8.
- Abete I, Parra D, Martínez JA (2008). Energy-restricted diets based on a distinct food selection affecting the glycemic index induce different weight loss and oxidative response. *Clin Nutr* 27:545-51.
- Rusolillo G, Astiasarán I, Martínez JA (2003). Intervención dietética en la obesidad. Eunsa, Pamplona.

**Tabla P51-5. LISTAS DE INTERCAMBIO DE VERDURAS TIPO A
(28 kcal, 5 g CH, 2 g proteínas, 0 g de lípidos)**

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
Acelgas	1 plato pequeño	100
Alcachofas	1 plato pequeño	100
Berenjenas	1 plato pequeño	100
Borraja	1 plato pequeño	100
Brócoli	1 plato pequeño	100
Cardo	1 plato pequeño	100
Champiñones/setas	1 plato pequeño	100
Coles/repollo	1 plato pequeño	100
Coliflor	1 plato pequeño	100
Espárragos	1 plato pequeño	100
Espinacas	1 plato pequeño	100
Judías verdes	1 plato pequeño	100
Puerros	1 plato pequeño	100
Tomate	1 plato pequeño	100
Zanahoria	1 plato pequeño	100

**Tabla P51-6. LISTAS DE INTERCAMBIO DE VERDURAS TIPO B²
(cantidades pequeñas de CH y kcal)**

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
Achicoria	2 plato mediano	100-200
Apio	2 plato mediano	100-200
Berro	2 plato mediano	100-200
Cebolla de guisar	1 unidad	100-200
Endibias	2 unidades	100-200
Escarola	2 plato mediano	100-200
Lechuga	2 plato mediano	100-200

¹taza de desayuno, ²consideradas de consumo libre.

Tabla P51-7. LISTAS DE INTERCAMBIO DE FRUTAS
(64 kcal, 15 g CH, 1 g proteínas, 0 g de lípidos)

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
Ciruelas	2 unidades	125
Frambuesa	13-15 unidades	150
Fresa/Fresón	13-15 unidades	175
Kiwi	1 unidad	125
Mandarina	2 unidades	150
Manzana	1 unidad pequeña	125
Melocotón	1 unidad	175
Naranja	1 unidad mediana	175
Peras	1 unidad mediana	150
Piña	1 rodaja mediana	125
Plátano	1 unidad pequeña	75
Sandía	2 tajadas medianas	350
Uvas	15 granos	100
Zumo manzana comercial	1 vasito tipo vino	125
Zumo melocotón-uva	1 vasito tipo vino	125
Zumo naranja comercial	1 vasito tipo vino	125
Zumo naranja natural	1 vasito tipo vino	125
Zumo piña comercial	1 vasito tipo vino	125

Tabla P51-8. LISTAS DE INTERCAMBIO DE AZÚCARES
(40 kcal, 10 g CH, 1 g proteínas, 0 g de lípidos)

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
Azúcar de mesa	2 cucharaditas café	10
Dulce demembrillo	2 lonchas finas	20
Jalea	3 cucharaditas café	15
Ketchup	4 cucharadas soperas	40
Leche condensada	3 cucharaditas café	15
Mermelada light	2 cucharadas soperas	25
Mermelada	3 cucharaditas café	15
Miel	3 cucharaditas café	15

**Tabla P51-9. LISTAS DE INTERCAMBIO DE FÉCULAS
(72,5 kcal, 15 g CH, 2 g proteínas, 0,5 g de lípidos)**

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
Galletas "María"	2-3 unidades	15
Arroz	1 cucharada sopera	20
Biscotes integrales	2 unidades	20
Copos de maíz tostados	2 cucharadas soperas	20
Harina de trigo	1 cucharada sopera	20
Harina integral	1 cucharada sopera	20
Muesli (Kellog's)	1 cucharada sopera	20
Pasta de sopa	1 cucharada sopera	20
Pasta espagueti	25-28 fideos finos	20
Pasta lasana	-	20
Pasta macarrones fino	2 cucharadas soperas rasas	20
Pan tostado (biscotes)	3 unidades	25
Cereales integrales	3 cucharadas soperas rasas	30
Pan blanco	1 rebanada mediana	30
Pan de molde	1 rebanada mediana	30
Pan integral	1 rebanada mediana	30
Pan de molde integral	1 rebanada mediana	35
Batata y boniato	1 unidad tamaño huevo	80
Patata	1 unidad tamaño huevo	80
Maíz cocido	-	150

Tabla P51-10. LISTAS DE INTERCAMBIO DE FÉCULAS: LEGUMBRES¹

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
Alubias	1,5 cucharadas soperas rasas	30
Garbanzos	1,5 cucharadas soperas rasas	30
Guisantes frescos	1 taza	100
Habas	1 bol mediano	175
Lentejas	1,5 cucharadas soperas rasas	30

¹Contabilizar 1/2 intercambio de proteína en la dieta, o dar las legumbres como plato único en la comida.

Tabla P51-11. LISTAS DE INTERCAMBIO DE FÉCULAS ESPECIALES¹

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
Galletas	3 unidades	20
Galletas tipo "digestive"	3 unidades	20
Madalenas	-	20
Pastas de té	3 unidades	20
Croissant	1/2 unidad	30

¹Contabilizar 1 intercambio de grasa en la dieta.

Tabla P51-12. LISTAS DE INTERCAMBIO DE ALIMENTOS PROTEICOS I
(37 kcal, 0 g CH, 7 g proteínas, 1 g de lípidos)

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
CARNES EXTRAMAGRAS		
Carne de caballo	-	30
Codorniz/Perdiz	-	30
Costilla de ternera	-	30
Faisán	-	30
Jamón cocido magro/york	2 lonchas finas	30
Pollo filetes	-	30
Solomillo de buey	-	30
Solomillo de ternera	-	30
VÍSCERAS		
Callos	-	40
Riñones de ternera	-	40
Tripas	-	40
PESCADOS MAGROS		
Bacalao fresco	-	40
Besugo	-	40
Gallo	-	40
Lenguado	-	40
Lubina	-	40
Merluza	-	40
Mero	-	40
Rape	-	40
Rodaballo	-	40
Trucha	-	40
Pescados pequeños	-	60

Tabla P51-13. LISTAS DE INTERCAMBIO DE ALIMENTOS PROTEICOS I
(37 kcal, 0 g CH, 7 g proteínas, 1 g de lípidos)

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
MARISCOS, CRUSTÁCEOS Y MOLUSCOS		
Bogavante/Langosta	-	40
Calamares	-	40
Cigala	-	40
Gambas/Langostinos	-	40
Almejas/Berberechos	-	60
Mejillones	-	60
Ostras	-	60
Percebes	-	60
Pulpo	-	60

Tabla P51-14. LISTAS DE INTERCAMBIO DE ALIMENTOS PROTEICOS II
(55 kcal, 0 g CH, 7 g proteínas, 3 g de lípidos)

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
CARNES MAGRAS		
Bistec de buey	-	30
Bistec de ternera	-	30
Cerdo magro	-	30
Conejo/Liebre	-	30
Jamón serrano magro	2 lonchas finas	30
Pavo	-	30
Pollo deshuesado	-	30
VÍSCERAS		
Corazón de cerdo	-	40
Higado de cerdo	-	40
Higado de cordero	-	40
Higado de pollo	-	40

Tabla P51-15. LISTAS DE INTERCAMBIO DE ALIMENTOS PROTEICOS II
(55 kcal, 0 g CH, 7 g proteínas, 3 g de lípidos)

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
PESCADOS GRASOS		
Anchoas frescas	-	40
Bonito	-	40
Boquerón	-	40
Palometa	-	40
Sardina	-	40
MARISCOS, CRUSTÁCEOS Y MOLUSCOS		
Cangrejos/nécoras	-	40
Centollo	-	40
OTROS ALIMENTOS		
Queso semigraso	1 porción pequeña	30
Quesitos desnatados	2 unidades	40
Requesón	3 cucharadas soperas	40

Tabla P51-16. LISTAS DE INTERCAMBIO DE ALIMENTOS PROTEICOS III
(73 kcal, 0 g CH, 7 g proteínas, 5 g de lípidos)

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
CARNES SEMIGRASAS		
Pato	-	30
VÍSCERAS		
Corazón de cordero	-	40
Corazón de ternera	-	40
Sesos de ternera	-	40
PESCADOS MUY RICOS EN GRASA		
Angulas	-	40
Arenques	-	40
Atún fresco	-	40
Salmón	-	40

Tabla P51-17. LISTAS DE INTERCAMBIO DE ALIMENTOS PROTEICOS III
(73 kcal, 0 g CH, 7 g proteínas, 5 g de lípidos)

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
OTROS ALIMENTOS		
Queso tipo Burgos	1 loncha	40
Queso fresco	1 loncha	40
Queso tipo quark	1 porción mediana	75

Tabla P51-18. LISTAS DE INTERCAMBIO DE ALIMENTOS PROTEICOS IV
(100 kcal, 0 g CH, 7 g proteínas, 8 g de lípidos)

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
CARNES RICAS EN GRASA		
Bacon paletilla	-	30
Chorizo	3 lonchas finas	30
Gallina	-	30
Jamón Ibético	2 lonchas finas	30
Butifarra	-	40
Carne picada/hamburguesa	-	40
Cerdo semigraso	-	40
Cordero chuletas	-	40
Costillas de cerdo	-	40
Chuletas de ternera	-	40
Lengua de ternera	-	40
OTROS ALIMENTOS RICOS EN GRASA		
Queso de bola	1 porción pequeña	30
Queso camembert	1 porción pequeña	30
Queso de cabrales	1 porción pequeña	30
Queso emmental	1 porción pequeña	30
Queso graso manchego	1 porción pequeña	30
Queso parmesano	1 porción pequeña	30
Queso roquefort	1 porción pequeña	30
Queso en porciones	2 unidades	40
Huevos	1 unidad	60

Tabla P51-19. LISTAS DE INTERCAMBIO DE ALIMENTOS PROTEICOS V
(>145 kcal, 0 g CH, 7 g proteínas, >13 g de lípidos)

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
CARNES EXTRAGRASAS		
Salchichón	-	30
Cerdo chuletas	-	40
Morcilla	-	40
Mortadela	-	40
Patés	-	40
Salami	-	40
Salchichas de Frankfurt	-	60

Tabla P51-20. LISTAS DE INTERCAMBIO DE GRASAS
(45 kcal, 0 g CH, 0 g proteínas, 5 g de lípidos)

Alimento	Medida culinaria	Cantidad (g)
GRASAS RICAS EN AC. GRASOS POLIINSATURADOS		
Aceite de girasol	1 cucharadita	5
Nueces	-	8
Piñones	-	8
GRASAS RICAS EN AC. GRASOS MONOINSATURADOS		
Aceite de oliva	1 cucharadita	5
Aguacate	-	30
Almendras	-	8
Avellanas	-	8
Cacahuetes	-	8
Mayonesa comercial (oliva)	1 cucharadita	5
Olivas	-	40
GRASAS RICAS EN AC. GRASOS SATURADOS		
Coco fresco	1 cucharada sopera llena	15
Mantequilla	1 cucharadita	5
Nata	2 cucharaditas	10
OTRAS GRASAS		
Margarina	1 cucharadita	5
Cerdo tocino	-	10
Manteca de cerdo	1 cucharadita	5

¹Contabilizar 1 intercambio de azúcar en la dieta.

Tabla P51-21. ASIGNACIÓN DEL NIVEL CALÓRICO TRAS APLICAR LA RESTRICCIÓN CALÓRICA DEL 30%

Grupos de alimentos	Valor calórico de la dieta											
	800	1.000	1.200	1.400	1.400	1.600	1.600	1.800	1.800	2.000	2.000	
Lácteos desnatados	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1	1	1	1		2	
Lácteos semidesnatados										2		
Lácteos enteros												
Verdura	1,5	2	2	4	3	4	4	3	3	4	4	
Fruta	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	
Azúcares										1	1	
Féculas	4	6	7,5	9	9	9	9	11	11	10	10	
Alimentos proteicos I	5	5	6	6		7		8		8		
Alimentos proteicos II					6		7		8		8	
Alimentos proteicos III												
Alimentos IV												
Alimentos V												
Grasas	4	5	6	7	5	8	5	9	6	9	7	

n.º de intercambios a consumir durante el día

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Nombre:
 Apellidos:
 Edad: Sexo: V M
 Peso (kg): Talla (cm):
 Actividad física:
 Factor de actividad física:
 GER (Harris-Benedict):
 Necesidades energéticas (GER × factor actividad):
DIETA PLANTEADA (-30% necesidades energéticas):
Intercambios
 Lácteos enteros:
 Lácteos semidesnatados:
 Lácteos desnatados:
 Verduras:
 Frutas:
 Féculas:
 Proteicos I:
 Proteicos II:
 Proteicos III:
 Proteicos IV:
 Proteicos V:
 Grasas:
 Azúcares:



COMENTARIOS

A large, empty light blue rectangular area intended for writing comments or notes.

Estudio SUN (Seguimiento Universidad de Navarra)

C. Sayón-Orea, A. Martí del Moral, J. A. Martínez Hernández
y M. A. Martínez-González

INTRODUCCIÓN

El estudio SUN es un estudio de cohortes prospectivas de carácter dinámico, lo que quiere decir que su reclutamiento es permanente y continuo. Es una cohorte multipropósito. Fue diseñado para establecer asociaciones entre la dieta y la ocurrencia de algunas enfermedades crónicas como por ejemplo diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares y obesidad entre otras. Se diseñó en colaboración con la escuela de Salud Pública de Harvard, y la metodología que sigue es muy similar a la de grandes cohortes americanas como la de *Nurses' Health Study* o *Health Professionals Follow-up Study*.

Este estudio se inició a finales de 1999, y a enero de 2010 contaba con más de 20.000 participantes, todos ellos graduados universitarios. Consta de un cuestionario basal, el cual recoge información sobre variables sociodemográficas (sexo, edad, estado civil, etc.), estilos de vida (actividad física, tabaquismo, etc.) así como también información relacionada con la salud y la dieta. La información dietética se recoge mediante un cuestionario semicuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos previamente validado en España por Martín-Moreno. La versión actual del cuestionario incluye 136 alimentos y recientemente se ha vuelto a validar.

Los participantes son seguidos cada dos años, y así se valoran los desenlaces, los cambios en los estilos de vida y las modificaciones en la dieta.

La asociación que existe entre el seguimiento de un patrón de dieta mediterránea y el riesgo de hipertensión, obesidad o síndrome metabólico, son algunos de los principales resultados encontrados hasta ahora en la cohorte SUN.

El cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) es un método directo de estimación de la ingesta de alimentos, que permite cuantificar tanto los alimentos como los nutrientes. Actualmente, es el método más utilizado en epidemiología nutricional cuando se pretenden estudiar asociaciones entre la dieta y alguna enfermedad, tanto en estudios de casos y controles como en estudios de cohortes. Es un método relativamente rápido, de bajo coste, no requiere de encuestadores adiestrados, y puede ser autoadministrado. Las limitaciones de este método radican principalmente en que su desarrollo y validación son muy laboriosos y tiene que establecerse la validez para cada nuevo cuestionario y población; en España, Martín-Moreno ha desarrollado y validado una versión adaptada del cuestionario del Prof. Willett usado en las grandes cohortes norteamericanas.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es conocer el cuestionario de consumo de frecuencia de alimentos, la forma de rellenarlo y su utilidad en epidemiología nutricional.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

El cuestionario semicuantitativo de consumo de frecuencia de alimentos consiste en una lista de alimentos en la que se debe marcar la frecuencia (diaria, semanal o mensual) de consumo de cada uno de los alimentos.

Consta de tres partes fundamentales:

- 1) Lista de alimentos.
- 2) Frecuencias de consumo en unidades de tiempo.
- 3) Porción estándar establecida como punto de referencia para cada alimento.

Material

Cuestionario semicuantitativo de consumo de frecuencia de alimentos utilizado en el proyecto SUN (ver anexo al final de la práctica).

Protocolo

La manera de rellenar el cuestionario es la siguiente:

- Se debe anotar la frecuencia de consumo de cada alimento durante el último año, marcando la respuesta que mejor la defina. Las 9 posibles opciones son: nunca o casi nunca, 1-3 al mes, 1 a la semana, 2-4 a la semana, 5-6 a la semana, 1 al día, 2-3 al día, 4-6 al día y más de 6 al día.
 - En el caso de que nunca haya tomado el alimento que se pregunta o lo haya ingerido con una frecuencia menor a 1 vez al mes, debe marcarse la opción nunca o casi nunca.
 - Para los alimentos de temporada o aquellos que sólo se consumen en ciertos períodos del año, se debe hacer una media. Una forma de calcularlo podría ser mediante las siguientes tablas:
- Si el consumo es sólo 3 meses al año (alimentos de temporada):

Si el consumo es:	Marcar:
1-3 veces al mes	Nunca
1 vez por semana	1-3 al mes
2-4 por semana	1-3 al mes
5-6 por semana	1 a la semana
1 al día	1 a la semana
2-3 al día	2-4 a la semana
4-6 al día	1 al día
+ de 6 al día	1 al día

- Si el consumo es durante 1/2 mes al año (por ejemplo, en Navidad):

Si el consumo es:	Marcar:
1-3 veces al mes	Nunca
1 vez por semana	Nunca
2-4 por semana	Nunca
5-6 por semana	1 al mes
1 al día	1 al mes
2-3 al día	1 al mes
4-6 al día	1 a la semana
+ de 6 al día	2-4 a la semana

En lo posible se debe intentar no dejar ninguna pregunta sin contestar. Es preferible un resultado que se aproxime a la realidad antes que dejar una respuesta en blanco.

Deben ajustarse las raciones a la frecuencia, según las cantidades que se especifican en el cuestionario. Por ejemplo, si se toman 100 gramos de queso de bola al día, y la cantidad especificada como ración corresponde a 50 gramos se debería marcar la casilla correspondiente a 2 veces al día, y no una.

BIBLIOGRAFÍA

- De la Fuente-Arrillaga C, Vázquez Ruiz Z, Bes-Rastrollo M, Sampson L, Martínez-González MA (2010). Reproducibility of an FFQ validated in Spain. *Public Health Nutr* 28:1-9.
- Fernández-Ballart JD, Piñol JL, Zazpe I, Corella D, Carrasco P, Toledo E, Pérez-Bauer M, Martínez-González MA, Salas-Salvado J, Martín-Moreno JM (2010). Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain. *Br J Nutr* 1-9.
- Martín-Moreno JM, Gorgojo L (2007). Valoración de la ingesta dietética a nivel poblacional mediante cuestionarios individuales: sombras y luces metodológicas. *Rev Esp Salud Pública* 81:507-518.
- Seguí-Gómez M, de la Fuente C, Vázquez Z, de Irala J, Martínez-González MA (2006). Cohort profile: The 'Seguimiento Universidad de Navarra' (SUN) study. *Int J Epidemiol* 35:1417-1422.
- Martín-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernández-Rodríguez JC, Salvini S, Willett WC (1993). Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol* 22:512-519.

ANEXO

Página

NÚMERO



En este cuadro debes repetir en las 6 casillas superiores el número que figura en el cuadro de la 1ª página y a continuación marcarlo igual que lo has hecho anteriormente.

NÚMERO					
0	1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11
12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29
30	31	32	33	34	35
36	37	38	39	40	41
42	43	44	45	46	47
48	49	50	51	52	53
54	55	56	57	58	59
60	61	62	63	64	65
66	67	68	69	70	71
72	73	74	75	76	77
78	79	80	81	82	83
84	85	86	87	88	89
90	91	92	93	94	95
96	97	98	99	100	

ENCUESTA DIETÉTICA

Por favor, marca una única opción para cada alimento.

Para cada alimento, marca el recuadro que indica la frecuencia de consumo por término medio durante el año pasado. Se trata de tener en cuenta también la variación verano/invierno. Por ejemplo si tomas helados 4 veces/semana sólo durante los 3 meses de verano, el uso promedio al año es 1/semana

	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO							
	NUNCA O CASI NUNCA	A LA SEMANA			AL DÍA			6+
		AL MES	1	2-4	5-6	1	2-3	
	1-3							
I LACTEOS								
Leche entera (1 taza, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leche semidesnatada (1 taza, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leche desnatada (1 taza, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leche condensada (1 cucharada)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nato o crema de leche (1/2 taza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Batidos de leche (1 vaso, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yogurt entero (1, 125 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yogurt descremado (1, 125 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Petit suisse (1, 100 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Requesón o cuajada (1/2 taza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Queso en porciones o cremoso (1 porción)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otros quesos: curados, semicurados (Manchego, Bola, Emmental...) (50 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Queso blanco o fresco (Burgos, cabra...) (50 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Natillas, flan, puding (1 taza, 200 cc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Helados (uno)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

(Dobla por esta línea)

Por favor, marca una única opción para cada alimento.

	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO							
	NUNCA O CASI NUNCA	A LA SEMANA			AL DÍA			6+
		AL MES	1	2-4	5-6	1	2-3	
	1-3							
II HUEVOS, CARNES, PESCADOS								
Un plato o ración de 100-150 gr. excepto cuando se indica otra cosa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nuevos de gallina (uno)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pollo o pavo CON piel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pollo o pavo SIN piel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Carne de ternera o vaca	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Carne de cerdo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Carne de cordero	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Conejo o liebre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hígado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otras vísceras (sesos, corazón, mollejas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jamón serrano o paletilla	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jamón York, jamón cocido (1 loncha)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Embutidos (chorizo, salchichón, mortadela, 50 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Salchichas (50 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patata, fide-gras (25 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Morcilla (50 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hamburguesa (unidad)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sobrasada (50 gr) / albóndigas (3 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tocino, bacon, panceta (50 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pescado blanco: pescadilla, merluza, besugo, mero, lenguado (1 plato, pieza o ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pescado azul: sardinas, atún, bonito, caballa, salmón (1 plato, pieza o ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bacalao	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pescados salados y/o ahumados: arenques, salmón	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ostras, almejas, mejillones, etc. (6 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gambas, langostinos, cigalas, etc.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pulpo, calamares, chipirones, jibia...	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ANEXO

Por favor, marca una única opción para cada alimento.

Un plato o ración de 250 grs, excepto cuando se indica	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO								
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1-3	A LA SEMANA			AL DÍA			
			1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+
III VERDURAS Y HORTALIZAS									
Acelgas, espinacas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Col, coliflor, brócolos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lechuga, erdibias, escarola	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tomate crudo (1, 150 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Zanahoria, calabaza	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Judías verdes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Berenjenas, calabacines, pepinos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pimientos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Espárragos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gazpacho andaluz	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otras verduras (borraja, cardo...)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Papas fritas (caseras, bolas, 1 ración, 150 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Papas asadas o cocidas (1 ración, 150 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Por favor, marca una única opción para cada alimento.

Una pieza o ración	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO								
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1-3	A LA SEMANA			AL DÍA			
			1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+
IV FRUTAS									
Naranja, pomelo (una), o mandarina (dos)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Plátano	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Manzana, pera	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fresas/fresones (6 unidades, plato postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Melocotón, albaricoque, nectarina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cerezas, picotas, ciruelas (1 plato de postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Higos, brevas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sandía (1 tajada, 200-250 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Melón (1 tajada, 200-250 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Uvas (un racimo, un plato postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frutas en almibar (2 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frutas en su jugo (2 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dátiles, higos secos, pasas, ciruelas-pasas (100 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Almendras, cacahuetes, avellanas, nueces (30 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aceitunas (10 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aguacates	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mangos, papaya	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kiwi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

¿Cuántos días a la semana tomas fruta como postre?

0 1 2 3 4 5 6 7

Por favor, marca una única opción para cada alimento.

Un plato o ración de 60 gr en seco	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO								
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1-3	A LA SEMANA			AL DÍA			
			1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+
V LEGUMBRES Y CERALES									
Lentejas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Garbanzos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alubias (pintas, blancas o negras)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Guisantes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pan blanco (3 rodajas, 60 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pan negro integral (3 rodajas, 60 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cereales desayuno (30 gr en seco)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Arroz blanco (60 gr en seco)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pasta: fideos, macarrones, espaguetis (60 gr en seco)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pizza (1 ración, 200 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

BARRIO 2010, 9:37 (Pág. 6)

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



Este apartado puede ser descriptivo (individual) o analítico basado en las pruebas estadísticas comprendidas y gráficos pertinentes.

COMENTARIOS



Elaboración de un protocolo de ética para estudios de intervención en humanos

M. A. Zulet Alzórriz y J. López Guzmán

INTRODUCCIÓN

Los estudios de intervención en humanos integran aquellas investigaciones orientadas hacia el avance del conocimiento médico, realizado por profesionales con experiencia en el tema y de acuerdo con un protocolo que establece el objetivo de la investigación, las razones de su empleo, la naturaleza y el grado de riesgos previstos y posibles, así como su relación con los beneficios que se esperan de sus resultados. Los estudios en seres humanos pueden ser terapéuticos o no terapéuticos. Ambos están sometidos a normas éticas que tienen su origen en el Código de Nuremberg (1947), elaborado después de las atrocidades cometidas en los campos de concentración alemanes durante la Segunda Guerra Mundial. El Código de Nuremberg prohíbe la experimentación sobre un sujeto humano sin su consentimiento voluntario. Este código ha sido, posteriormente, reformado y ampliado en las Declaraciones de Helsinki y Tokio.

Los requisitos para efectuar un ensayo sobre seres humanos son los siguientes:

- 1) Experimentación básica y animal previa.
- 2) Consentimiento informado del sujeto.
- 3) Libertad del sujeto para interrumpir el tratamiento.
- 4) Índice adecuado entre beneficios y riesgos.
- 5) Solvencia del investigador.
- 6) Prevalencia del interés individual frente al colectivo.
- 7) Existencia de un protocolo experimental.
- 8) No privar al enfermo de un tratamiento reconocido.
- 9) Fidelidad en la publicación de los resultados.
- 10) Aprobación por un Comité de Ética de Investigación.

Los proyectos de investigación biomédica en seres humanos requieren, con antelación a su desarrollo, contar con la aprobación por un Comité de Ética de la Investigación (CEI) acreditado según la ley de investigación biomédica 14/2007. El CEI será el encargado de evaluar el valor científico del protocolo que le es presentado, así como de comprobar si respeta las normas legales vigentes y satisface los requisitos exigidos por la ética de la investigación biomédica. Este Comité puede proponer a los investigadores los cambios oportunos para lograr la conformidad del protocolo con las normas legales y éticas. En caso de cumplimiento, el CEI expedirá el certificado correspondiente que permite comenzar el estudio de intervención y que estará abierto para el seguimiento por el CEI.

Cada vez es más frecuente la realización de ensayos clínicos con alimentos de los que se procura demostrar que, más allá de su aportación nutricional, pueden ejercer una influencia beneficiosa sobre las funciones fisiológicas. Este es el caso de los denominados “alimentos funcionales”. A este respecto hay que recordar que el Reglamento CE 353/2008 (que desarrolla el Reglamento CE 1924/2006 sobre declaraciones nutricionales y alegaciones de salud) establece que para la autorización de algunas alegaciones de salud son imprescindibles, entre otros, datos de los estudios realizados en humanos.

OBJETIVO

El objetivo de esta sesión práctica consiste en facilitar la elaboración de la documentación co-

responsable a una intervención nutricional que va a ser sometida a su evaluación por el Comité de Ética de Investigación (CEI).

PROCEDIMIENTO

Fundamento

A partir de las características del estudio de intervención nutricional facilitadas, se elaborará la documentación a presentar al CEI, a partir del siguiente protocolo de trabajo.

Material

Características de un ejemplo de estudio de intervención nutricional:

- Patología estudiada: sobrepeso-obesidad.
- Tipo de estudio: paralelo, doble ciego, aleatorizado.
- Grupos en estudio: dos (control y en estudio).
- Número de voluntarios: 20 en cada grupo incluyendo tasa de abandono del 25% una vez llevada a cabo la estadística.
- Características participantes: hombres y mujeres de 35-65 años e IMC 25-34,9 kg/m².
- Duración intervención: dos meses con seguimiento quincenal.
- Producto a estudiar: alimento bajo en grasa dentro de una dieta hipocalórica (~30% del valor calórico total).
- Variable principal: reducción de masa grasa corporal.
- Variables a analizar: antropométricas, composición corporal, bioquímicas y de ingesta dietética.

Protocolo

- **Título del estudio:** claro y conciso.
- **Investigador responsable:** indicar el nombre, centro al que pertenece, dirección de contacto.
- **Lugar de desarrollo:** datos del departamento/s, centro/s, etc.
- **Justificación:** breve resumen que muestre los antecedentes y situación actual que justifica el interés por el estudio, así como la aplicabilidad propuesta o validez de los resultados esperados. Incluir bibliografía.

- **Hipótesis y objetivos:** plantear la hipótesis de trabajo, el objetivo global y los objetivos parciales que se esperan alcanzar.
- **Metodología:** incluye el diseño experimental detallado.
- **Consentimiento informado: incluir dos hojas:**
 - Hoja de información al sujeto (voluntario sano, paciente o responsable legal): en ella debe explicarse, en lenguaje comprensible por el sujeto, su finalidad investigadora y los aspectos más relevantes del proyecto y de la participación del voluntario (objetivo, lugar de desarrollo del estudio, personal que atenderá, duración, medidas que se llevarán a cabo en el paciente y riesgos derivados, cuestionarios a cumplimentar y el tiempo que se tardará en cumplimentar, condiciones en las que debe acudir a cada cita...). Además incluirá un apartado sobre el tratamiento de confidencialidad de datos y la remuneración o no por su participación en el estudio.
 - Hoja(s) para firma del consentimiento: el voluntario muestra su conformidad en la participación y la posibilidad de abandono cuando así lo considere. Se presenta en duplicado, una para el voluntario y otra para el investigador.
- **Memoria económica del proyecto:** indicar el modo de financiación del proyecto y el presupuesto pormenorizado previsto para su realización.
- **Experiencia del equipo investigador:** formación de cada investigador especificando su participación en el proyecto. Responsable del reclutamiento de los sujetos, de quien dependerá el acceso a los datos de la historia clínica y quien se responsabilizará de la custodia y manipulación de las muestras biológicas.
- **Anexos:** cuestionarios utilizados (p.ej., cartel utilizado para el reclutamiento de voluntarios, modelo de registro de historia dietética empleado, etc.).

BIBLIOGRAFÍA

- Goyenechea E, Parra D, Crujeiras AB, Abete I, Martínez JA (2009). A nutrigenomic inflammation-related PBMC-based approach to predict the weight-loss regain in obese subjects. *Ann Nutr Metab* 54(1):43-51.
- Hermisdorff HH, Zulet MA, Abete I, Martínez JA (2009). Discriminated benefits of a Mediterranean

dietary pattern within a hypocaloric diet program on plasma RBP4 concentrations and other inflammatory markers in obese subjects. *Endocrine* 36: 445-451.

Martínez-Gómez D, Gómez-Martínez S, Puertollano MA, Nova E, Wärnberg J, Veiga OL, Martí A, Campoy C, Garagorri JM, Azcona C, Vaquero MP, Redondo-Figuero C, Delgado M, Martínez JA, García-Fuentes M, Moreno LA, Marcos A, EVASYON

Study Group (2009). Design and evaluation of a treatment programme for Spanish adolescents with overweight and obesity. The EVASYON Study. *BMC Public Health* 15(9): 14-424.

López Guzmán J (2009). La autonomía del paciente en la farmacia comunitaria. *AuladelaFarmacia* 61(5): 47-60.

Smith T (1999). *Ethics in Medical Research*. Cambridge. Cambridge University Press.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

- Título del estudio:
- Investigador responsable:
- Lugar de desarrollo:
- Justificación:
- Hipótesis y objetivos:
- Metodología:
 - Diseño del estudio: tipo de estudio, períodos, duración, visitas.
 - Participantes: reclutamiento, cálculo del tamaño muestral, criterios de inclusión.
 - Descripción del producto a ensayar y dieta asignada.
 - Procedimiento a seguir en cada visita y variables a analizar.
 - Cronograma.
 - Tratamiento de muestras y datos personales.
- Memoria económica del proyecto:
- Experiencia del equipo investigador:
- Anexos:

HOJA INFORMATIVA PARA EL PARTICIPANTE
Proyecto de intervención nutricional TITULADO:

En esta primera cita se le hace entrega de esta hoja informativa para que usted la lea y pregunte sus posibles dudas sobre el proyecto. A continuación se le hace entrega de la hoja de consentimiento informado, por duplicado y aprobado por el Comité de Ética, para que muestre su conformidad.

Esta hoja informativa le invita a participar de forma totalmente voluntaria en el Proyecto sobre

El objetivo concreto de este estudio es

Para participar en este proyecto usted tiene que estar de acuerdo en acudir al departamento/centro donde será atendido por

El estudio de intervención nutricional consistirá en la ingesta dedurante..... Está contemplada la participación de un total devoluntarios como usted divididos en grupos.

Si usted acepta participar en el estudio, el médico del equipo le realizará una breve entrevista y una historia clínica con exploración física..... En el caso de que usted cumpla los criterios de inclusión, se le seleccionará para participar en el estudio.

Este estudio tiene una duración total de..... con visitas periódicas cada..... días. En cada una de las visitas se le llevará a cabo las siguientes medidas..... a las que deberá acudir en

La dietista se ocupará de la historia dietética durante el período de intervención haciéndole entrega de

La enfermera llevará a cabo la extracción de sangre en las siguientes condiciones.....

El estudio concluirá con la valoración de la

El hecho de participar en el estudio implica riesgos controlados para la salud. Durante la extracción de sangre puede sentir dolor y es frecuente la aparición de hematomas en la zona del pinchazo, y excepcionalmente puede sufrir mareo. Ninguna otra prueba de las que le realizaremos implica un riesgo para su salud.

Toda la información que nos proporcione así como los resultados de los análisis de sangre se tratará según la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, utilizando códigos para asegurar la confidencialidad y garantizar el anonimato. Sólo los miembros del equipo investigador encargados de contactar con usted para cualquier evento relacionado con el estudio conocerán sus datos personales. El resto de miembros del equipo trabajarán con códigos, ignorando a qué voluntario le corresponde cada código.

El Comité Ético de Investigación ha revisado los objetivos y procedimientos del estudio y ha dado la aprobación favorable para su realización.

NO/SI está contemplada la remuneración económica por su participación en el estudio.

Formulario de consentimiento (COPIA 1)

ESTUDIO DE INTERVENCIÓN EN HUMANOS TITULADO:.....

Yo (nombre y apellidos)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con: (nombre del investigador)

Entiendo que mi participación es voluntaria.

Entiendo que puedo retirarme del estudio:

- 1.º Cuando quiera.
- 2.º Sin tener que dar explicaciones.
- 3.º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha

Firma del participante

Fecha

Firma del investigador

Formulario de consentimiento (COPIA 2)

ESTUDIO DE INTERVENCIÓN EN HUMANOS TITULADO:.....

Yo (nombre y apellidos)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con: (nombre del investigador)

Entiendo que mi participación es voluntaria.

Entiendo que puedo retirarme del estudio:

- 1.º Cuando quiera.
- 2.º Sin tener que dar explicaciones.
- 3.º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha

Firma del participante

Fecha

Firma del investigador



COMENTARIOS

A large, empty rectangular area with a light blue gradient background, intended for writing comments or notes.

Búsqueda bibliográfica

J. Campión Zabalza, A. M. Gómez-Úriz y J. A. Martínez Hernández

INTRODUCCIÓN

Las revistas científicas se publican desde hace más de cien años y constituyen el medio de comunicación más usado para transmitir los resultados originales de la investigación. Junto con las patentes, constituyen una de las fuentes de información primarias y en ellas se publica información precisa y directa sobre los resultados originales de la investigación y expresan en virtud de su actualidad el estado de la Ciencia en un momento determinado.

Los líderes y referencia mundial en lo relativo a la búsqueda bibliográfica podrían ser considerados el *Institute for Scientific Information* perteneciente a la corporación *Healthcare & Science business* de Thomson Reuters y la *National Library of Medicine* (Biblioteca Nacional de Medicina, NLM) de Estados Unidos. El primero es responsable del *ISI Web of Knowledge* que es un servicio en línea de información científica que facilita el acceso a un conjunto de bases de datos bibliográficas y otros recursos que abarcan todos los campos del conocimiento académico, como el *Journal Citation Reports* (JCR) que es una publicación anual con los principales indicadores a la hora de evaluar la actividad científica en Europa y EE. UU. Por otro lado, la NLM es quizá la biblioteca de biomedicina más grande del mundo. Produce distintas bases de datos e índices, entre ellos el *Index Medicus* (1879-2004), MEDLINE (desde 1971), *MedlinePlus.gov* (desde 1998), *Ensayo clínico.gov* (desde 2002) y *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (desde 1988).

De todas las bases de datos de referencias bibliográficas en biomedicina, MEDLINE es la más completa y compleja y está disponible en forma

gratuita a través de Internet mediante el uso de un motor de búsqueda o del correo electrónico. MEDLINE recoge referencias bibliográficas de los artículos publicados en unas 4.800 revistas médicas desde 1966. Cada registro de MEDLINE es la referencia bibliográfica de un artículo científico publicado en una revista médica, con los datos bibliográficos básicos de un artículo (título, autores, nombre de la revista, año de publicación), que permiten la recuperación de estas referencias posteriormente en una biblioteca o a través de software específico de recuperación. Para acceder mediante Internet a esta base de datos se utiliza PubMed, permitiendo el acceso a más de 12 millones de citas desde MEDLINE.

OBJETIVO

El objetivo de esta sesión práctica es facilitar el uso del motor de búsqueda PubMed con el propósito de realizar trabajos bibliográficos relacionados con la Nutrición y la Dietética y que se encuentran en la base de datos MEDLINE de la Biblioteca Nacional de Estados Unidos.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Las búsquedas bibliográficas en la actualidad son más fáciles de realizar y su resultado es más completo gracias a la introducción de las citas bibliográficas en bases de datos. Estas bases de datos son rápidamente exploradas a partir de la

información disponible por poderosos motores de búsqueda. Para familiarizarse sobre la búsqueda bibliográfica se propone MEDLINE, ya que es de uso gratuito y es una de las bases de datos más completas y complejas disponibles on-line actualmente. Aunque MEDLINE es muy potente y eficaz, no hay que considerar por completa una búsqueda bibliográfica realizada solamente en esta base de datos, y consultar otras como *ISI Web of Knowledge*.

La clave de una buena búsqueda bibliográfica con estas herramientas es tener claro el propósito final y disponer de la pregunta a resolver. A partir de ella extraeremos las “palabras clave” a introducir en el motor de búsqueda. Una vez formulada la pregunta adecuada, se ha de adoptar una adecuada estrategia de búsqueda para intentar responderla. Así, por ejemplo, la estrategia es diferente dependiendo de si se realiza una búsqueda bibliográfica sobre la producción científica de un autor determinado o de una universidad determinada o si, por el contrario, queremos profundizar en un tema en particular (por ejemplo: absorción intestinal de azúcares y aminoácidos) con el objetivo de actualizarnos en los avances recientes sobre el tema.

Material y requerimientos

- Un ordenador.
- Tener instalado un navegador, como pueden ser Internet Explorer, Google Chrome o Mozilla Firefox.
- Acceso a Internet.

Protocolo

Una vez con el ordenador encendido y asegurado de que se dispone de acceso a Internet, es necesario arrancar el navegador de su elección, al que habrá que indicarle la dirección web de PubMed, que puede ser:

- www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed,
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- o la más sencilla, www.pubmed.com, que redirecciona a las direcciones anteriores de NLM.

Una vez conectado, la pantalla del ordenador mostrará una imagen de bienvenida similar a la figura P54-1. Desde esta misma página se podría realizar una búsqueda sencilla mediante la introducción de un texto libre en la zona indicada como (1) y pulsar con el ratón en la pestaña Search (2).

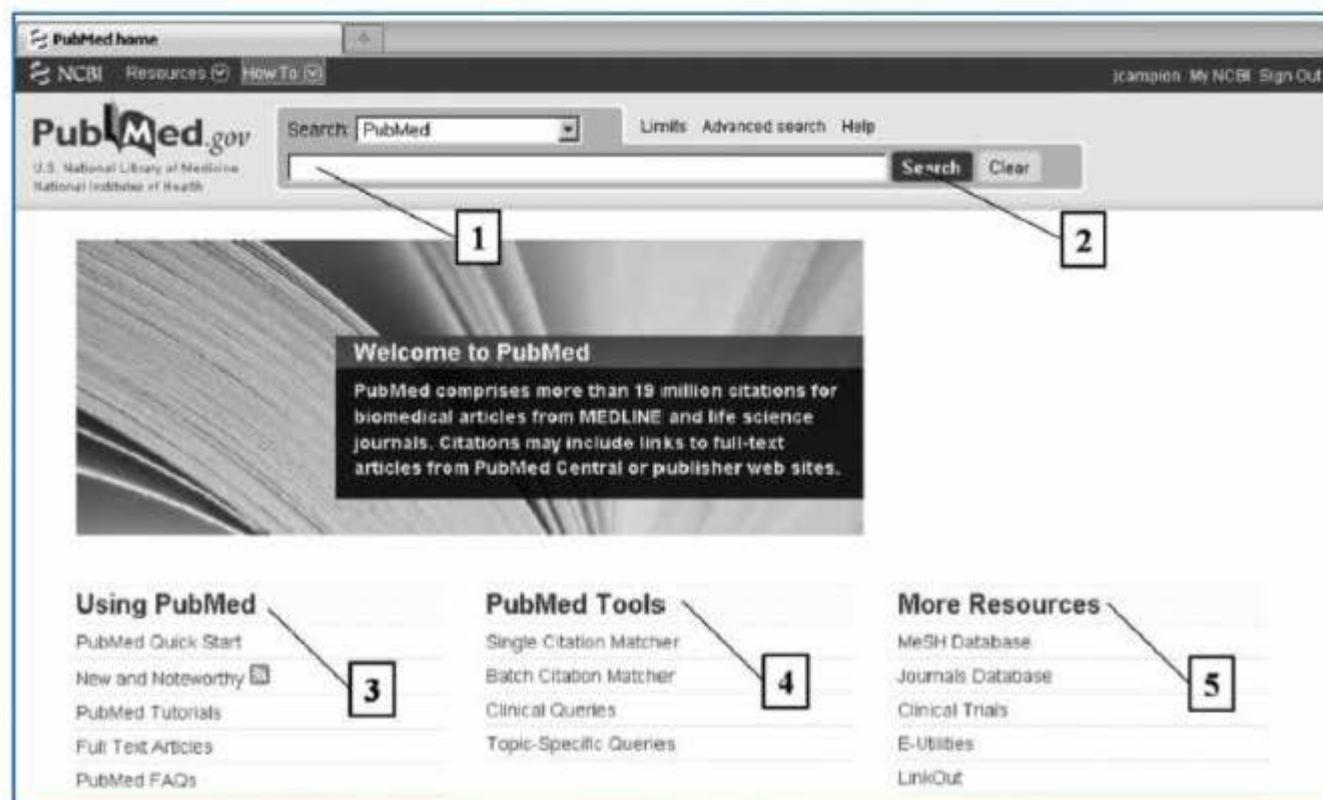


Figura P54-1. Imagen que muestra la pantalla de bienvenida del motor de búsqueda PubMed.

Dentro de la complejidad del motor de búsqueda PubMed, con sólo estos sencillos pasos se puede disponer de la información solicitada. Por otro lado, destacar que NLM dispone de amplios tutoriales y ayudas para buscar en MEDLINE mediante PubMed (3), así como numerosas herramientas (4) para automatizar y profundizar en las búsquedas realizadas por profesionales y especialistas, así como enlaces a otros recursos y bases de datos del NLM (5) y que están relacionadas con las búsquedas de bibliográficas, como la de revistas científicas (*Journal Database*).

En este momento y de acuerdo con nuestro propósito final se introducen los términos de búsqueda específicos y se guarda la información obtenida para alcanzar nuestro objetivo. Por supuesto, las palabras a introducir en los campos de búsqueda deben ser escritas en inglés preferentemente, y tanto este motor de búsqueda como los resultados obtenidos estarán en este idioma. Así, por ejemplo, se empiezan buscando todos los trabajos sobre absorción intestinal que se encuentran en MEDLINE poniendo dentro de la casilla (1)

“intestinal absorption” y pulsando Search (2). El navegador conectado a PubMed nos devolverá una página similar a la figura P54-2. En primer lugar habrá que fijarse en el número de resultados (6) que devuelve el buscador. La búsqueda habrá resultado más o menos específica, y también más o menos eficaz según el número mostrado. Además nos indica que se están mostrando las 20 primeras citas de su base de datos que coinciden con los términos de búsqueda solicitados, y en formato Summary que incluye título, autores, revista y año, así como el identificador PMID (*PubMed Identifier*) de interés para biblioteconomía (7).

Muchas veces, para profundizar en la búsqueda se necesita que PubMed devuelva los resultados en otros formatos. Para ello se utiliza la opción Display Settings (8), que activará la ventana (9) y donde tras pulsar Apply, podemos modificar distintas opciones de presentación, como decidir si se incluye el “abstract” o resumen, el número de citas por página o el orden en el que se muestran. Además, al pulsar el “hyperlink” de cada cita, PubMed devuelve todos los datos de dicha cita,

The screenshot shows the PubMed search results page for the query "intestinal absorption". The search bar at the top contains the query and the "Search" button. The results are displayed in a list format, with the first result being "Transport of a Hydrophilic Paclitaxel Derivative, 7-Kyloxy-10-Deacetylpaclitaxel, by Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells". A "Display Settings" dialog box is open, showing options for Format (Summary, Abstract, MEDLINE, XML, PMID List), Items per page (5, 10, 20, 50, 100, 200), and Sort by (Recently Added, Pub Date, First Author, Last Author, Journal, Title). A "Choose Destination" dialog box is also open, showing options for File, Clipboard, Collections, E-mail, and Order. The page includes a "Filter your results" section with options for All (46589), Review (6475), and Free Full Text (7767). The "Titles with your search terms" section lists related terms like "intestinal lipid absorption" and "intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for".

Figura P54-2. Imagen descriptiva de diferentes opciones de la página principal de PubMed, tras la realización de una búsqueda inicial.

incluyendo el “abstract” si existe, así como enlaces de acceso al recurso completo si está disponible en la red o si está previamente pagado su acceso por la Institución desde donde se conecte.

Tan importante como una búsqueda adecuada es saber presentar y guardar los resultados obtenidos. Para realizar estas tareas, PubMed dispone de las opciones que aparecen al pulsar Send to (10) y se muestran en la figura con (11). Estas opciones resultan prácticas y potentes, y permiten desde exportar las citas seleccionadas (12) en otros formatos hasta crear colecciones que quedan guardadas en el servidor del NLM.

Si la búsqueda solicitada ha resultado demasiado extensa, es necesario acotar ésta mediante diferentes estrategias. La forma más potente, aunque quizás la más compleja de manejar, queda reflejada en el punto 13 de la figura P54-2, dentro de las herramientas Limits, Advanced Search y Manage Filters. Limits puede ser el más intuitivo

a utilizar. Dentro de todas las opciones de límites se puede acotar la búsqueda para lograr obtener la información más útil y de la manera más eficaz. Así, podemos acotar el año de publicación, tipo de artículo, idioma, nombre de la revista donde se ha publicado la cita, etc. De este modo se puede seleccionar, por ejemplo, los últimos artículos en español sobre absorción intestinal del último año. Por el contrario, Advanced Search y Manage Filters son para un nivel aún más avanzado y profesional donde PubMed va a almacenar nuestros filtros e historial de manera automatizada y a los que se puede acceder de manera rápida, sin tener que solicitarlos cada vez.

Una forma sencilla de modificar la especificidad de la búsqueda es usar los operadores lógicos AND, OR y NOT. Al usar AND, que en definitiva equivale a dejar un espacio en blanco, nos presenta todas las citas donde estén presentes ambas palabras, sin necesidad de que estén juntas. Por ejem-

Tabla P54-1. ETIQUETAS UTILIZADAS EN PUBMED PARA REALIZAR BÚSQUEDAS ESPECÍFICAS DE MANERA MANUAL

Nombre del campo	Abreviatura	Descripción	Ejemplo
<i>Affiliation</i>	[AD]	Dirección y afiliación institucional del primer autor	University of Navarra [AD]
<i>All fields</i>	[ALL]	Incluye todos los campos de búsqueda de PubMed	Nutrition [ALL]
<i>Author Name</i>	[AU]	El formato para buscar un autor es Apellido, seguido de espacio y la/s primeras iniciales sin puntos	Hautvast J [AU]
<i>Journal Name</i>	[TA]	Nombre de la publicación	Br J nutr[TA]
<i>MeSH Terms</i>	[MH]	El vocabulario controlado de la NLM <i>Medical Subject Headings</i> sobre términos biomédicos que se usan para describir cada artículo de una revista científica en MEDLINE	Diet [MH]
<i>Publication Type</i>	[PT]	Describe el tipo de material que el artículo representa (p. ej., <i>Review, Clinical trials, Retracted Publications, Letters</i>)	Review [PT]
<i>Title Words</i>	[TI]	Palabras encontradas en el título de un artículo	Vitamin C[TI]

plo, escribiendo **oxygen AND mitochondria AND nutrition**, devolverá todas las citas que contengan las tres palabras. Al usar **OR**, por el contrario, estamos tratando de ampliar nuestra búsqueda escribiendo sinónimos de nuestra palabra clave o abreviaturas. Así se obtiene una búsqueda más sensible, o sea con mayor número de citas. Por ejemplo, si se quiere encontrar todos los artículos que se hayan publicado por grupos científicos situados en Francia o en España pondremos **Spain OR France**. Es útil también cuando el primer intento de búsqueda devuelve un número limitado de citas. Al usar **NOT** estamos prescindiendo de un grupo de citas del grupo general en el cual estamos buscando. También se reduce el número de citas y se hace más concreta nuestra búsqueda. Por ejemplo, si se quiere buscar todos los artículos sobre mitocondrias, que no incluyan la palabra rata, pondremos **mitochondria NOT rat**.

Finalmente, muchas veces interesa, por diferentes motivos, acotar o ampliar la búsqueda de manera manual, lo que suele resultar más rápido e intuitivo. Una búsqueda manual avanzada incluye el conocer el nombre de la etiqueta de los campos de búsqueda y así, de esta manera, se puede ser más detallado en cuanto a la exploración o búsqueda de cada término. Para ello se coloca la etiqueta correspondiente (Tabla P54-1) entre corchetes y separado por un espacio en blanco después de la palabra clave que escribimos. A este respecto indicar también que para trincar

las palabras se puede usar un comodín (*). La búsqueda la realizará sobre las palabras que comiencen con dicha raíz. Esta estrategia trae las primeras 150 variantes y no se puede utilizar con frases. Por ejemplo: si coloco la palabra **diet***, traerá **diets, dietary, dietetics**, etc. Además, si se quiere obligar al buscador a buscar una frase se usarán comillas (“ ”) para encerrarla, de lo contrario por cada espacio en blanco que separe las palabras de la frase interpretará un **AND**. Por ejemplo: “nutritional intervention”.

BIBLIOGRAFÍA

- Baladia E, Basulto J (2006). Introducción a la búsqueda de información en Internet de interés para dietistas-nutricionistas (2): bases de datos electrónicas especializadas, el primer paso hacia la evidencia científica. *Actividad Dietética* 32:22-27.
- García Díaz F (1999). Búsqueda de bibliografía médica a través de Internet. El proyecto PubMed. *Med Clin (Barc)* 113:58-62.
- González Guitián, C. Buscar en PudMed con MedLine (guía de uso). URL disponible en http://www.fisterra.com/recursos_web/no_explor/pubmed.htm (último acceso, 28-abril-2010).
- Sanz-Valero, Wanden-Berghe C (2006). Nutrition Search Terms Have Changed: Making the Most of Thematic Search Filters. *Journal of Nutrition* 139:1203.
- Wikipedia. Medline, World Wide Web y National Library of Medicine. <http://es.wikipedia.org/wiki/> (último acceso, 28-abril-2010).

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS





COMENTARIOS

A large, empty rectangular area with a light blue gradient background, intended for users to write their comments or notes.

INTRODUCCIÓN

La estadística se encarga de describir de qué manera y cuándo utilizar diferentes procedimientos matemáticos y cómo interpretar los resultados obtenidos de estos procedimientos. La estadística descriptiva intenta “describir”, cuantificando y resumiendo los datos disponibles. La estadística inferencial o analítica, a su vez, pretende extraer consecuencias científicas de los datos, estableciendo asociaciones entre diferentes características de interés o variables. Esto es, extraer conclusiones generalizables a una población (inaccesible en la práctica) de la cual se obtuvo la muestra disponible.

Una variable de tipo cuantitativo expresa una cantidad (p. ej.: altura, edad). Las variables cualitativas expresan una cualidad. Si ésta admite graduación (ordenación o jerarquía) hablaremos de variable cualitativa ordinal (p. ej.: estadio de cáncer, nivel educativo). Si no existe ordenación posible, la variable será entonces cualitativa nominal (p. ej.: estado civil, sexo). Es importante distinguir cada tipo de variable para evitar errores en la aplicación e interpretación de los procedimientos estadísticos.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es conocer los principales índices estadísticos empleados para describir la distribución de variables, aprender a calcular probabilidades y familiarizarse con métodos de estadística inferencial como la T de Student.

PROCEDIMIENTO

Bioestadística descriptiva

Los índices estadísticos son números que resumen la información contenida en los datos reales. Algunos como las proporciones (porcentajes) o frecuencias describen los datos de tipo cualitativo, la mayoría resumen la información de variables de tipo cuantitativo:

Medidas de tendencia central: estos índices expresan qué valor es más típico o representativo en la muestra. Destacan la media aritmética, la mediana y la moda. La media aritmética se calcula sumando todos los valores de la muestra y dividiendo esta suma por el número total de sujetos. La mediana corresponde al valor central de un conjunto de datos ordenados de menor a mayor y es útil cuando poseemos valores extremos en la distribución de datos. La moda es el valor más frecuente.

Medidas de dispersión: establece el grado de variabilidad de las observaciones, cuánto de separados se encuentran unos datos de otros. Destacan la varianza, la desviación típica o estándar (s) y el coeficiente de variación. Las fórmulas de la varianza (s^2) y la desviación típica o estándar (s) se expresan a continuación:

$$\text{Varianza} = s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

$$\text{DE} = s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Siendo x_i cada observación o dato, \bar{x} la media aritmética y n el tamaño de muestra.

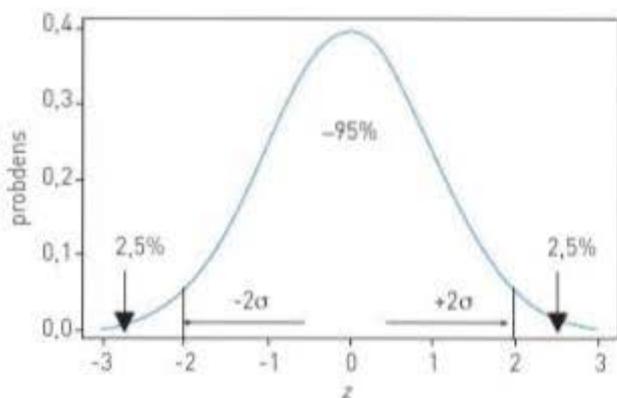
El coeficiente de variación es el cociente entre la s y la \bar{x} y es utilizado cuando queremos comparar la dispersión de dos series de datos que presentan diferentes unidades de medida.

Bioestadística inferencial

El principal objetivo de los investigadores es extrapolar los resultados obtenidos en su muestra a una población diana inaccesible para ellos. En la muestra únicamente podremos calcular estimadores. Éstos describen una característica de la población, pero únicamente de forma aproximada ya que su cálculo se basa en valores obtenidos en una muestra de dicha población. Ejemplos de estimadores serían la media (\bar{x}), la desviación típica muestral (s) o la proporción (p). El valor de esa característica en la población se denomina parámetro y obviamente no puede ser calculado ya que carecemos de los datos de toda la población. Los parámetros se expresan habitualmente con letras griegas. Por ejemplo la media poblacional se representa con μ , la desviación típica con σ y la proporción con π .

Distribución normal

Esta distribución es seguida por variables continuas como la edad o la altura. Se conoce también como **campana de Gauss**. Tiene forma de campana, es simétrica, no es excesivamente plana ni picuda y en ella coinciden la media, la mediana y la moda ya que en esta distribución son frecuentes los valores intermedios y más raros los valores extremos. Además, el 95% de los individuos se encuentra dentro del intervalo $\mu \pm 1,96\sigma$ y casi el 100% de los valores se encuentran dentro del intervalo $\mu \pm 3\sigma$.



Se habla de **densidad de probabilidad**, concepto que se refiere a la probabilidad de que un sujeto tenga un valor de variable incluido en un intervalo entre dos valores. ¿Y cómo la calculamos? Para ello es necesario **tipificar** o **estandarizar** la normal. Este proceso no es otro que transformar la distribución normal de media μ y desviación σ en otra con media igual a 0 y desviación igual a 1. Para ello debe aplicarse la siguiente fórmula:

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

Donde x es el valor de la antigua variable y z el valor de la nueva variable de media = 0 y desviación = 1. El valor z expresa a qué número de desviaciones estándar se coloca nuestro valor con respecto a la media poblacional.

A cada valor z le corresponde un valor teórico de probabilidad que puede consultarse en cualquier libro de estadística o a través de programas informáticos. Todo el área bajo la curva se traduce en una probabilidad de 1 (100%). Cuando z es positivo, el valor de probabilidad es aquél que queda por encima de z . Si z es negativo, el valor de probabilidad corresponde al área por debajo del valor.

Contraste de hipótesis

El contraste de hipótesis consiste, generalmente, en establecer asociaciones entre variables recogidas en una muestra y determinar hasta qué punto estas variables se asocian en la población. Normalmente se establecen una o más variables independientes (exposición) y una variable dependiente (desenlace). La intención es determinar hasta qué punto la variable dependiente “depende” de la/s variable/s independiente/s en la población. Para llevarlo a cabo deben seguirse una serie de pasos:

1. Debe establecerse una hipótesis *a priori*, denominada hipótesis nula (H_0), contraria justo a aquello que se desea demostrar, y una hipótesis alternativa (H_1) que defiende la asociación entre variables.

Por ejemplo, si deseo valorar la asociación entre la práctica de deporte (v. independiente) y el

peso (v. dependiente) en la población, la H_0 será la ausencia de efecto del deporte sobre el peso. Es decir, la media de peso en la población será igual entre los que practican y no practican deporte. La H_1 establecerá que sí están asociadas las variables y que el peso en la población "depende" de ser o no activo.

$$H_0 = \mu_{\text{peso en no dep}} = \mu_{\text{peso en dep}}$$

O lo que es lo mismo: diferencia $\mu_{\text{dep-no dep}} = 0$.

$$H_1 = \mu_{\text{peso en no dep}} \neq \mu_{\text{peso en dep}}$$

Sin embargo, no se dispone de los datos de actividad física y peso de toda la población (se desconoce el parámetro dif μ) pero, a través de una muestra, pueden calcularse estimadores, es decir, la diferencia de peso en la muestra según se haga o no deporte (diferencia $\bar{x}_{\text{dep-no dep}}$).

2. Se contrastan los datos de la muestra con la hipótesis nula.

Si la hipótesis nula fuera cierta, la dif μ , ya hemos dicho que sería 0. Sin embargo, imaginemos que entre los deportistas el peso medio es de 70 kg y que entre los no deportistas es de 77 kg. La diferencia de peso es de 7 kg en nuestra muestra. ¿Hasta qué punto es 7 distinto de 0?

3. Se calcula la probabilidad (el denominado valor p) de haber hallado este resultado u otro todavía más alejado, bajo el supuesto de que la hipótesis nula fuera cierta. Para este cálculo deben calcularse dos valores: el "efecto" (es decir, la diferencia entre el valor observado en la muestra y el valor esperado en la población si H_0 fuera cierta) y el "error". El "error" es un error aleatorio, los resultados obtenidos en la muestra serían explicables por simple azar. El valor del cociente entre el "efecto" y el "error" se aproxima al valor de una distribución teórica de probabilidad (existen varias: la distribución z , la distribución t , etc.) si H_0 fuera cierta. Por tanto, puede calcularse la probabilidad de obtener un valor $\geq z$, $\geq t$, etc., condicionado a que todo fuera azar. Este valor de probabilidad recibe el nombre de valor p de significación estadística.

El denominado "efecto" del deporte encontrado en la muestra es 7 kg (diferencia entre lo observado y lo esperado si H_0 fuera cierta). Imaginemos que, en este ejemplo, el error vale 3,2. Para este ejemplo, la distribución de probabilidad elegida es la distribución t . t valdría $7/3,2 = 2,16$. Si buscamos en tablas, a un valor t de 2,16 le corresponde un valor p de 0,044. La probabilidad de encontrar una diferencia de 7 kg o aún mayor (recordemos que la probabilidad hallada corresponde a un valor $\geq z$) es del 4,4% si H_0 fuera cierta. Es decir, si todo fuera azar, si el deporte no tuviera efecto sobre el peso, la probabilidad de encontrar una diferencia de 7 o más kg entre los que practican y no practican deporte, sería sólo del 4,4%.

4. Decidir si rechazamos o no la hipótesis nula. Habitualmente y de manera arbitraria, se acepta como valor límite para rechazar o no la hipótesis nula, un valor $p = 0,05$ (α). Si el valor p obtenido con los datos es inferior a 0,05, existen evidencias significativas de efecto por lo que debe rechazarse la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa. Si el valor p es superior a 0,05, no existen evidencias significativas para rechazar la hipótesis nula. Los resultados obtenidos son debidos al azar. De todas formas, he podido equivocarme (existe un error α de equivocarme, en este caso del 5%). Es decir, he podido rechazar la hipótesis nula siendo en realidad cierta.

En nuestro ejemplo $p = 0,044$ es significativo por lo que debemos rechazar H_0 . Existen diferencias estadísticamente significativas entre el peso de los sujetos de la población que practican y que no practican deporte. Si realmente el deporte no se asociara con el peso, la probabilidad de haber encontrado la diferencia hallada o una mayor sería sólo del 4,4%. El límite se había establecido en el 5%.

Existen diferentes procedimientos estadísticos para llevar a cabo contrastes de hipótesis (Tabla P55-1). La aplicación de unos u otros depende principalmente del tamaño de muestra de que dispongamos y del tipo de variables "a contrastar" (cuantitativas y/o cualitativas). Por ejemplo:

Tabla P55-1. PRINCIPALES PRUEBAS ESTADÍSTICAS EMPLEADAS EN CIENCIAS DE LA SALUD

Variable independiente	Variable dependiente	Prueba	Ejemplo	Hipótesis nula	Distribución
Cualitativa nominal/ordinal	Cualitativa	Ji cuadrado	Asociación entre el estado civil (soltero, casado) y la obesidad (no/sí)	Π obes. Solteros = Π obes. casados	χ^2 (Ji-cuadrado)
Cualitativa ordinal	Cualitativa	Ji ² tendencia lineal	Asociación entre fumar (no fumar, exfumador, fumador) y el cáncer de pulmón (no/sí)	Π cáncer no fum < Π cáncer exfum < Π cáncer fum	χ^2 (Ji-cuadrado)
Cualitativa dicotómica (2 categorías)	Cuantitativa (con distribución normal)	T de Student U de Mann-Whitney*	Asociación entre hacer deporte (no/sí) y el nivel de colesterol (mg/dL)	μ colest no deporte = μ colest sí deporte	t z si $n > 100$
Cualitativa policotómica (> 2 categorías)	Cuantitativa	ANOVA Kruskal-Wallis*	Asociación entre hacer deporte (nada/moderado/intenso) y el colesterol (mg/dL)	μ colest no dep. = μ colest. dep. mod. = μ colest. dep. intenso	F de Snedecor
Cuantitativa	Cuantitativa	Regresión lineal simple	Asociación entre la edad y la tensión arterial sistólica (TAS)	TAS = $\alpha + \beta \times$ Edad β [coef. regr. = pendiente = 0]	t

*Las pruebas de la U de Man-Whitney o de Kruskal-Wallis son pruebas llamadas no paramétricas o de distribución libre empleadas generalmente cuando el tamaño de la muestra es muy pequeño.

Prueba de la T de Student

El ejemplo citado anteriormente se resolvería a través de la aplicación de una prueba de la T de Student. La fórmula para obtener el valor de la distribución teórica, en nuestro caso distribución llamada *t*, es la siguiente:

$$t = \frac{\text{Dif medias muestrales}}{\text{Error}} = \frac{(\bar{x}_{dep} - \bar{x}_{no\ dep})}{S_p \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

Donde *n* es el tamaño de muestra en cada grupo y *S_p* es la desviación estándar ponderada obtenida a través de la fórmula:

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}}$$

siendo *s*² la varianza en cada grupo.

BIBLIOGRAFÍA

- Martínez-González MA, de Irala-Estévez J (2006). Procedimientos descriptivos. En "Bioestadística amigable". Martínez-González MA, Sánchez-Villegas A, Faulín-Fajardo J (eds.). pp: 13-78. Díaz de Santos, Madrid.
- Martínez-González MA, Sánchez-Villegas A, Toledo-Atucha E (2006). Probabilidad. Distribuciones de probabilidad. En "Bioestadística amigable". Martí-

nez-González MA, Sánchez-Villegas A, Faulín-Fajardo J (eds.). pp: 79-154. Díaz de Santos, Madrid.
Martínez-González MA, de Irala-Estévez J (2006). Intervalos de confianza y contraste de hipótesis. En

“Bioestadística amigable”. Martínez-González MA, Sánchez-Villegas A, Faulín-Fajardo J (eds.). pp: 155-233. Díaz de Santos, Madrid.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS



1. Cálculo de las principales medidas de tendencia central: a partir de los siguientes datos de edad (en años): 23, 34, 45, 45, 49, 51, 60, 62, 70.

Media: $(23 + 34 + 45 + 45 + 49 + 51 + 60 + 62 + 70)/9 = 48,8$

Mediana: 49

Moda: 45

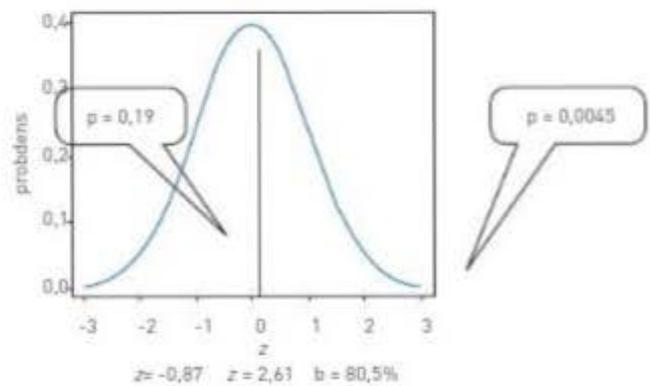
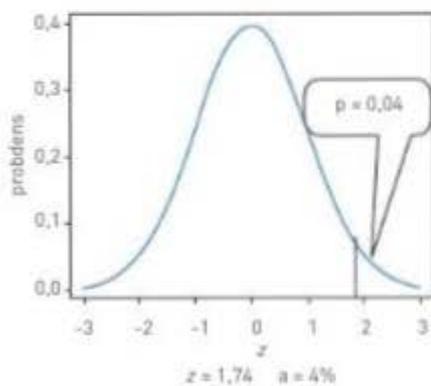
2. Cálculo de probabilidades: a) ¿Cuál es la probabilidad de que un individuo presente un valor de colesterol mayor de 220 mg/dL, si la media en su población es de 180 mg/dL y la desviación σ vale 23?
b) ¿Y entre 160 y 240? c) ¿Y entre 200 y 230?

$$\text{a) } z = \frac{220 - 180}{23} = 1,74$$

$$\text{b) } z_1 = \frac{160 - 180}{23} = -0,87 \quad z_2 = \frac{240 - 180}{23} = 2,61$$

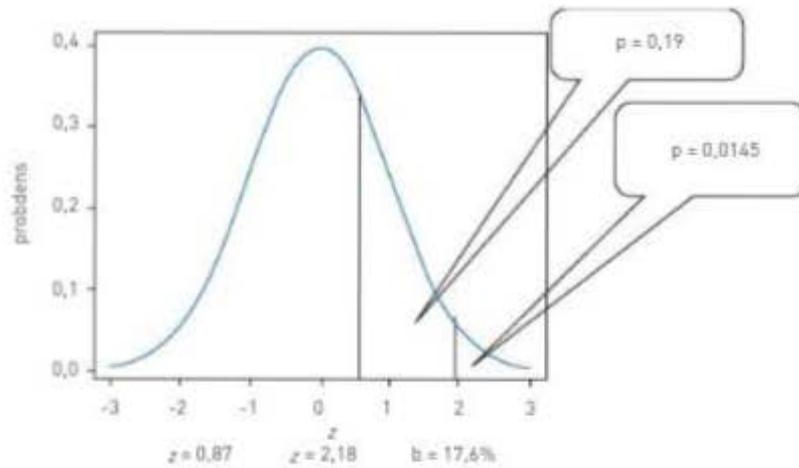
A un valor $z = 1,74$ le corresponde un valor p de 0,04.

Se calculan 2 valores z . El área de probabilidad que nos interesa será de $1 - 0,19 - 0,0045 = 0,805$



$$\text{c) } z_1 = \frac{200 - 180}{23} = 0,87 \quad z_2 = \frac{230 - 180}{23} = 2,18$$

En este ejemplo, para calcular la probabilidad de encontrarse entre 200 y 230, debemos calcular la diferencia entre la probabilidad asociada a $z = 0,87$ ($p = 0,19$) y la probabilidad asociada a $z = 2,18$ ($p = 0,0145$).



3. Cálculo de la T de Student: imaginemos 20 participantes de un estudio, 12 de ellos no practican deporte habitualmente mientras que 8 sí que lo hacen. Los pesamos y obtenemos los siguientes datos:

En el ejemplo:

$$\bar{x}_1 = 77 \quad \bar{x}_2 = 70$$

$$n_1 = 12 \quad n_2 = 8$$

$$s_1 = 8,5 \quad s_2 = 4$$

$$S_p = \sqrt{\frac{(12 - 1) 72,25 + (8 - 1) 16}{(12 - 1) + (8 - 1)}} = 7,1$$

$$t = \frac{(\bar{x}_{no\ dep} - \bar{x}_{dep})}{S_p \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} = \frac{77 - 70}{7,1 \sqrt{\left(\frac{1}{12} + \frac{1}{8}\right)}} = \frac{7}{3,24} = 2,2$$

Identificación	Deporte	Peso
1	No deporte	75
2	No deporte	78
3	No deporte	69
4	No deporte	89
5	No deporte	79
6	No deporte	76
7	No deporte	71
8	No deporte	95
9	No deporte	64
10	No deporte	73
11	No deporte	72
12	No deporte	80
13	Sí deporte	72
14	Sí deporte	65
15	Sí deporte	65
16	Sí deporte	67
17	Sí deporte	69
18	Sí deporte	73
19	Sí deporte	76
20	Sí deporte	71

Debemos observar la tabla de distribución *t* para determinar si nuestro valor *t* es mayor que el que aparece en tablas (correspondiente a una probabilidad de 0,05). Si es así, podrá rechazarse la hipótesis nula y se demostraría que existen diferencias significativas entre medias. Hay que tener en cuenta que, en el caso de esta distribución, no sólo es necesario saber su valor sino que deben tenerse en cuenta también los grados de libertad que se calculan como $N - 2$, siendo $N = n_1 + n_2$. Para un error del 5%:

g.l.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>t</i>	12,7	4,3	3,2	2,8	2,6	2,4	2,4	2,3	2,3	2,2	2,2	2,2	2,2	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1

En el ejemplo, 2,2 es mayor que 2,1 (por tanto, su valor *p* es inferior a 0,05), por lo que se rechaza la hipótesis nula. El hacer deporte se asocia con el peso de los sujetos. Las medias de peso entre deportistas y no deportistas son significativamente diferentes.

**COMENTARIOS**

Índice analítico

Los números de página seguidos por f indican una figura; los seguidos por c un cuadro; los seguidos por t una tabla.

A

Absorciometría dual de rayos X (DEXA), 249

Acetil-coA carboxilasa, 158

Ácido graso sintasa, 158

Actividad

– física, 40

– – valoración, 301

– glutatión reductasa eritrocytaria, 275, 277t

– lipolítica *in vitro*, 151

– SOD, 359

Adipocitos, 145

– 3T3-L1, 363

Adipogénesis, 363

Adipoquinas, 145

Agua, 17, 64

– utilización nutritiva, 26

Albumina, 74, 263

Alcohol, 26

– efectos tóxicos, 213

– etílico, 213

– utilización nutritiva, 26

Alcoholemia, 189

Alcoholismo, 213

Aleatorización, 106

Alimentación

– ciencias, 3

– complementaria, 55

Alimento(s), 3

– acción termogénica, 40

– composición, 11

– fracciones, 13

– grupos básicos, 14t

– utilización nutritiva, 15

– valor nutritivo, 13

– – carne, 13

– – cereales, 14

– – frutas, 14

– – leche, 13

– – pan, 14

– – verduras, 14

– valoración calórica, 432t

Alimentos

– evolución histórica, 4

– índice glucémico, 133

– tecnología, 4

Amilasa salival, 123

Aminoácido(s), 25

– cómputo químico, 175

– factor de respuesta, 186

– limitante, 178

Aminoacidopatía(s), 183

Anabolismo, 18

Análisis

– bioquímicos, 73

– combinados, 112

– estadísticos, 101

– funcionales, 96t

– hematológicos, 73

Anciano

– recomendaciones nutricionales, 63

Antioxidantes fisiológicos, 62

Antropometría, 231

Aporte dietético recomendado, 47

ATP, 65

Ayudas ergogénicas, 67

Azúcares, absorción intestinal, 127

B

β -carotenos, 199

Balance

– energético, 35, 40

– hídrico, 195

Balance

- de nitrógeno, 176
- de nutrientes, 92
- Beikost*, 55
- Bioestadística
 - descriptiva, 467
 - inferencial, 468
- Biología molecular, 88r
- Biomarcadores inmunológicos, 285
- Bomba calorimétrica, 119
 - adiabática, 119
- Bonferroni, 103
- Bromatología, 4
- Búsqueda bibliográfica, 461

C

- Calcio, 207
 - en orina, 207
- Capacidad lipogénica, 157
- Carga glucémica, 133
- Carne, 13
- Catabolismo, 18
- Cenizas, 13
- Cereales, 14
- Ciencias de la Alimentación, 3
- Cirrosis, 213
- Citoplasma celular, 158
- Cociente respiratorio, 91
- Codex alimentario, 139
- Coefficiente de digestibilidad proteica, 176
- Colesterol, 163
 - metabolismo hepático, 163
- Compleción, 71t
- Composición corporal, 35, 41, 72, 247
- Cómputo químico, 178
- Consumo energético, 38
- Correlación, 104
- Creatinina en orina, 229t
 - concentración, 227
- Crecimiento, 52, 231
 - en la adolescencia, 231
 - curvas, 231
 - en la infancia, 231
 - niñas
 - curva 0-3 años, 234
 - tabla 0-3 años, 236
 - niños
 - curva 0-3 años, 235
 - tabla 0-3 años, 236
 - tablas, 231

- Cromatografía líquida de alta eficacia, 183
- Cuestionario(s)
 - de comportamiento de alimentación infantil, 343
 - de conducta de alimentación infantil CEBQ, 339
 - de frecuencia de consumo de alimentos, 309
- Cultivos celulares, 362, 363
- Curva de glucemia, 134

D

- Densitometría, 90
- Deportista
 - recomendaciones dietéticas, 65
- Derechos humanos, 97r
- Dieta(s)
 - de adelgazamiento por sobrepeso, 431
 - confección, 417
 - confección, programa informático, 423
 - equilibrada, 45, 47, 49
 - experimentales, 93
 - global, 49
 - para pérdida de peso, 42
- Dietética, 4
- Dietoterapia, 4
- Directiva 2008/100/CE, 9
- Directiva 881/82/CEE, 8
- Diseños epidemiológicos, 104
 - clasificación, 108f
- Duncan, 103
- Dunnet, 103

E

- Ejercicio
 - agua, 67t
 - hidratos de carbono, 66t
- Electroforesis, técnica, 385
- Embarazo, 56
 - recomendaciones nutricionales, 57
- Encuesta(s)
 - dietéticas, 309
 - transversales, 109
- Energía, 36
 - consumo total, 40
 - digestiva aparente, 36
 - metabolizante, 36
 - neta, 36
- Enfermedad(es)
 - celíaca, 137
 - renal crónica, 331

Enfermos renales, 331
 Ensayo(s)
 – de digestibilidad, 90
 – factoriales, 111
 – múltiples, 111
 – microbiológicos, 88
 Envejecimiento, 61
 Epidemiología
 – experimental, 110
 – no experimental, 108
 Epidemiología nutricional, 103t
 Epigenética, 397
 Equilibrio hidroelectrolítico, 195
 Error
 – tipo 1, 102
 – tipo 2, 102
 Estadios de Tanner, 245
 Estadística, 467
 Estado(s)
 – nutricional, 69, 231
 – – cuestionarios de valoración rápida, 317
 – – evaluación, 69
 – – – objetivos, 70
 – – – bioquímica, 293
 – – técnicas de envaluación, 70t
 – – valoración, programa informático, 423
 – – celular, 359
 – – tisular, 359
 Esteatosis, 213
 Estudio SUN, 445
 Estudio(s)
 – caso-control, 109
 – comunitarios, 106
 – cuasi-experimentales, 111
 – ecológicos, 109
 – en epidemiología nutricional, 106t
 – de intervención en humanos, 453
 – nutricionales
 – – diseño y análisis, 99
 – – en humanos, 92
 Ética, protocolo, 453
 Evaluación nutricional, pruebas bioquímicas, 95t
 Examen clínico, 97
 Extracto
 – etéreo, 13
 – libre de nitrógeno, 13

F

Factor(es)
 – hiperglucemiantes, 20

– hipoglucemiantes, 20
 Fármaco(s), 79
 – absorción, 81
 – excreción urinaria, 82
 – metabolismo, 82
 Fenilcetonuria, 183
 – tratamiento dietético, 186
 FESNAD, 48t
 Fibra
 – bruta, 13
 – dietética, 64
 Fracción de componentes nitrogenados, 13
 Fructosa, intolerancia, 251
 Frutas, 14

G

Galactosa, intolerancia, 252
 Gasto energético total, 301
 – en adolescentes, 303t
 – en adultos, 304t
 – en ancianos, 304t
 – en el embarazo, 305t
 – en la lactancia, 302t, 305t
 – en niños, 303t
 Genómica, 391
 Gestación
 – nutrición, 56
 Gliadinas, 137
 Glicerol liberado, 152
 Glucemia basal, 134
 Glúcidos, 17
 Glucólisis, 19f
 Gluten, 137
 – clasificación de los alimentos, 138t
 – productos exentos, 137
 Grasas, 17

H

Hidratos de carbono, 15
 – clasificación, 21t
 – fuentes, 21t
 – funciones, 21t
 – intolerancia, 251
 – requerimientos, 21t
 Hidroperóxidos, 359
 Hidroxiprolina, 207
 Hidroxiprolina, 216
 Hierro
 – biodisponibilidad, 270t

Hígado

- contenido en colágeno, 214
- contenido graso, 214

Hipotálamo, 348

Hipótesis, verificación, 102t

Historia

- clínica, 76, 97
- dietética, 75

I

IMC, 73t

- chicas 0-18 años, 242
 - chicos 0-18 años, 241
- Impedancia bioeléctrica, 248
- Indicadores nutricionales, 98
- Índice
- de eficacia proteica, 177
 - glucémico, 133
 - de masa corporal (IMC), 73t
 - de Quetelet, 94
 - nutritivos biológicos, 179
 - pronósticos, 77

Ingesta(s)

- adecuada, 47
- dietéticas de referencia, 47, 417
- dietéticas de referencia para la población española, 48t

Inmunoensayo enzimático, 137

Inmunohistoquímica, 87

Insulina, niveles plasmáticos, 351

Interacción(es)

- fármaco-nutriente, 79, 80t, 83t, 355, 356t
- - clasificación, 80t, 81t

Intolerancia a

- fructosa, 251
- galactosa, 252
- hidratos de carbono, 251
- lactosa, 251
- sorbitol, 251

Investigación

- científica, 99
- - características, 100r
- - estadística, 100
- - medidas, 100
- nutricional
- - animal, ética, 89r
- - modelo animal, 89

Isótopos estables, 377

J

Justus Von Liebig, 5

K

Kilocalorías, 35

Kit ingezim gluten, 139t

Kjeldahl, 11

L

Lactancia

- artificial, 54
- materna, 54

Lactosa, intolerancia, 251

Lavoisier, 5

Leche, 13

Leptina, niveles plasmáticos, 351

Lipasa sensible a hormonas, 151

Lípidos, 17

- clasificación, 23t
 - fuentes, 23t
 - funciones, 23t
 - requerimientos, 23t
 - situaciones
 - - lipogénicas, 23
 - - lipolíticas, 23
 - utilización nutritiva, 22
- Lipogénesis *de novo*, 157
- Lipólisis, 18f, 151
- Listas de intercambio, 331, 335t
- Longevidad, 61

M

Macrominerales, 25

Malnutrición, 53

Material bibliográfico, 355

Medicamento(s), 79

Medida(s)

- antropométricas, 70
 - bioquímicas, 94
 - de dispersión, 467
 - de tendencia central, 467
- Metaanálisis, 112
- Metabolismo, 18
- basal, 38, 217
 - energético, 36
 - hidrocarbonado, 74
 - lipídico, 74

- lipídico, alteraciones, 257
- de nutrientes, 20
- oxidativo mitocondrial, 371f
- proteico, 74
- índices, 263
- de las vitaminas, 74

Método(s)

- cromatográfico, 191
- multivariantes, 104
- de Widmark, 191

Microminerales, 26

Microsomias, 165

Minerales, 17, 27t, 75

- biodisponibilidad, 269
- clasificación, 30t
- fuentes, 30t
- funciones, 30t
- requerimientos, 30t
- utilización nutritiva, 25

Mini Nutritional Assessment, 317

Mitocondrias

- hepáticas, 371

Modelos bicompartimentales, 94

N

Nivel de ingesta máxima tolerable, 47

Núcleo arqueado, 348

Nutrición, 4

- en el anciano, 60
- y deporte, 65
- enteral, 409
- y estado nutricional, 69
- en la gestación, 56
- humana, 51
- crecimiento, 52
- investigación, 85
- técnicas, 86r
- *in vitro*, 86
- en el lactante, 53
- lactancia
- artificial, 54
- materna, 54
- recomendaciones dietéticas, 54
- y longevidad, 61

Nutrientes, 15

- agua, 15
- digestión, 123
- grasas o lípidos, 15
- hidratos de carbono o glúcidos, 15
- ingesta, 75

- minerales, 15
 - proteínas, 15
 - vitaminas, 15
- Nutrigenética, 397

P

Pair-fed, 90

Pan, 14

Pearson, 104

Percentiles

- IMC chicas 0-18 años, 242
- IMC chicos 0-18 años, 241
- peso
- chicas 2-18 años, 238
- chicos 2-18 años, 237
- niñas 0-3 años, 235
- niños 0-3 años, 234
- talla

- chicas 2-18 años, 240

- chicos 2-18 años, 239

- niñas 0-3 años, 235

- niños 0-3 años, 234

Perímetro braquial, 72

Peso, 35, 227

- chicas curva 2-18 años, 238

- chicos curva 2-18 años, 237

- niñas curva 0-3 años, 235

- niñas tabla 0-3 años, 236

- niños curva 0-3 años, 234

- niños tabla 0-3 años, 236

Peso corporal, 41

Pliegues cutáneos, 72, 248

Prevalencia, 105

Pridoxina, 281

Prolaminas, 137

Proteína(s), 17

- completas, 175
 - digestibilidad, 176
 - incompletas, 175
 - calidad nutritiva, 175
 - clasificación, 25t
 - contenido proteico, 179
 - eficacia, 91
 - fuentes, 25t
 - funciones, 25t
 - índices biológicos proteicos, 177
 - plasmáticas, 74
 - requerimientos, 25t
 - utilización nutritiva, 23
- Proteómica, 385

Protocolo de ética, 453
Puntajes de conducta de alimentación, 341

R

Ratio
– de control respiratorio, 373
– de eficacia de las proteínas, 91
Recomendación(es)
– dietéticas, 45
– nutricionales para adultos sanos, 419t
– de nutrientes, 46
Regulación del apetito, 347
Requerimiento medio estimado, 47
Respuesta inmune, 75
Retinol, proteína transportadora, 263

S

Scheffe, 103
Sistema(s)
– gastrointestinal, 347
– nervioso centra, 347
– subcelulares, 88
Sobrepeso, 431
Sorbitol, intolerancia, 251
Soxhlet, 11
Spearman, 104

T

Tabla de composición de alimentos, 417
Tanner, estadios, 245
Técnica(s)
– *in vitro*, 86
– Inmunoensayo enzimático, 137
Tecnología alimentaria, 4, 6
Termogenina, 385

Test
– en aliento, 377t, 378f
– de funcionalidad, 98
Transaminasas, 213, 215
Transcriptómica, 391
Transferrina, 74, 263
Transtiretina, 263
Triglicerido lipasa, 151

U

Utilización proteica neta, 177

V

Valor
– biológico proteico, 177
– p, 101
Valoración nutricional, 77
Verduras, 14
Vitamina B2, 275
Vitamina B6, 281
– valores de referencia, 282t
Vitamina C, 203
Vitamina D, 207
Vitaminas, 17, 26, 31t
– clasificación, 34t
– fuentes, 34t
– funciones, 34t
– requerimientos, 34t
– utilización nutritiva, 26

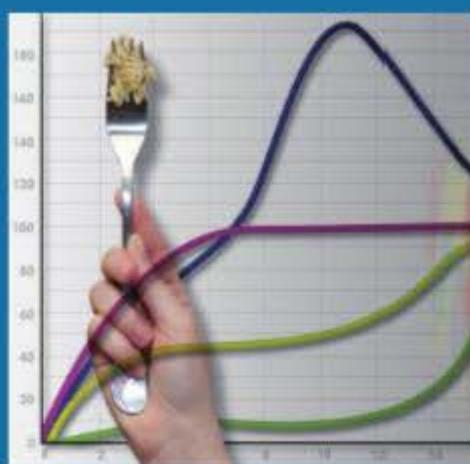
W

Weende, 11, 85
Western-Blot, técnica, 385

Z

Z-score, 233

Martínez • Portillo



Fundamentos de Nutrición y Dietética

Bases metodológicas y aplicaciones

Las publicaciones sobre temas de Nutrición y Dietética han experimentado un importante auge en las últimas décadas, evidenciando la importancia de la alimentación sobre la salud. Ante tanta oferta, la educación nutricional y la formación en temas de dietética constituyen un reto para el estudiante y el profesional. En esta obra práctica, de ágil lectura y complementada con abundante material gráfico, se destacan las siguientes características:

- Presenta información actualizada sobre la composición y el análisis de los alimentos, el metabolismo de los nutrientes, las ingestas de referencia recomendadas y la nutrición en las diferentes etapas de la vida.
- Aborda temas importantes como las interacciones entre fármacos y nutrientes, la evaluación del estado nutricional y la aplicación del método científico en la investigación en nutrición.
- Incluye capítulos con la descripción de aplicaciones prácticas que siguen el esquema clásico de las publicaciones científicas: introducción, objetivos, material y métodos, presentación de resultados, conclusiones y bibliografía relevante, y tratan entre otros, aspectos punteros de la nutrigenómica, la nutrigenética y la metabolómica, así como los métodos clásicos enfocados desde una óptica innovadora.

Una obra preparada para cubrir las demandas de un nutrido grupo de profesionales de la salud, docentes e investigadores, estudiantes y graduados, así como aquellos colectivos interesados en los fundamentos y las aplicaciones de la nutrición y la dietética con una perspectiva del siglo XXI.