

EVALUACION DE LA CALIDAD DE LA PROTEINA EN HUMANOS, CON ENFASIS EN METODOLOGIA

Dres. Fernando E. Viteri y Jorge Alvarado
Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá
Guatemala, C. A.

Es obvia la urgente necesidad de suministrar mayores cantidades de proteínas de alto valor biológico a grandes sectores de la población latinoamericana que, por razones de índole socioeconómica, ingieren cantidades subóptimas o claramente insuficientes de este nutriente. Tarea innecesaria sería, pues, subrayar este problema, ya que tanto los diversos sectores que se dedican a la nutrición humana como aquellos empeñados en actividades que en una forma u otra persiguen mejorar la disponibilidad de proteínas para el hombre, están más que conscientes de esa urgencia.

A través de numerosas encuestas nutricionales se ha logrado documentar en definitiva, que en la mayor parte de las poblaciones en vías de desarrollo (1), las deficiencias calórica y proteínica afectan a la población general, en particular a niños menores de un año o de edad preescolar. Por otro lado, los estudios sobre la disponibilidad futura de alimentos indican que si la producción de éstos y el incremento demográfico continúan a su velocidad actual, esas deficiencias, si no es que aumentan, por lo menos prevalecerán a un grado semejante al que hoy día tienen en la mayoría de las áreas subdesarrolladas (2). Ambas situaciones constituyen una razón de peso para estimular la concentración de esfuerzos conducentes a incrementar, a corto plazo, la disponibilidad de mayores cantidades de proteínas y calorías para nuestras poblaciones.

Las proteínas pueden provenir ya sea de fuentes tradicionales, o bien de fuentes nuevas de uso no convencional. Se ha demostrado ya la eficacia de algunas de estas últimas como buenas fuentes de proteína de alto valor biológico para consumo humano, y esto significa la apertura de nuevos horizontes en la lucha contra la deficiencia proteínica. La calidad biológica de los alimentos, cualquiera que sea su fuente, puede establecerse determinando su contenido de nitrógeno total y el patrón de aminoácidos esenciales. Sin embargo, la poca información con que se cuenta, por un lado acerca de los requerimientos mínimos de aminoácidos y de nitrógeno bajo distintas condiciones fisiológicas y patológicas, así como en lo referente a la disponibilidad biológica de los aminoácidos de los alimentos en distintas condiciones de ingestión proteínica, y por el otro, en lo relativo al balance que debe existir entre éstos, no permite predecir con exactitud la calidad de la proteína proveniente de fuentes no convencionales, por medio de dichos métodos.

Los ensayos biológicos en animales son necesarios, por lo tanto, y constituyen una importante fuente de información previo al empleo de estos nuevos alimentos en humanos con fines experimentales o de cualquier otro tipo, ya que los resultados de dichos ensayos - realizados bajo condiciones bien definidas - dependen en gran medida de la calidad biológica de la proteína sometida a prueba (3). No obstante, existen diferencias en cuanto a requerimientos de nitrógeno y aminoácidos en las diferentes especies y bajo diferentes condiciones fisiológicas. Por este motivo es necesario confirmar la información obtenida tanto por análisis químico como por pruebas biológicas, valiéndose de experimentación en humanos.

En este trabajo se describen y comentan diversas técnicas empleadas para determinar la calidad proteínica de los alimentos, con énfasis en la metodología que se usa en el Centro Clínico del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. No se aborda ninguno de los otros importantes aspectos que involucra el someter a prueba la calidad de un alimento para consumo humano, como son su aceptabilidad y tolerancia y sus características de producción, conservación y mercadeo. Obviamente, todos ellos son también elementos fundamentales en el desarrollo de fuentes no convencionales de proteínas.

Metodología

En general, los estudios orientados a determinar la calidad de proteínas en humanos deben llevarse a cabo en sujetos de edades y condiciones fisiológicas similares a las de aquéllos para quienes ha de dedicarse el alimento. El sujeto más sensible para estudios de calidad proteínica es el niño en rápido crecimiento, ya que sus necesidades calóricas, proteínicas y de aminoácidos no sólo son altas por unidad de peso, sino también tendrán que satisfacerse con una ingesta total de alimento relativamente pequeña (4). De ahí que si una proteína demuestra ser de calidad adecuada para el lactante, sin duda alguna lo será también para individuos de más edad. Sin embargo, lo inverso no es necesariamente cierto. Por ejemplo, las mezclas proteínicas diseñadas específicamente para la edad del destete (a ser consumidas por niños mayores de cuatro meses) puede que no siempre sean adecuadas para niños recién nacidos, por las razones ya expuestas.

Finalmente, hay que tener presente que el empleo de niños desnutridos como sujetos de estudio para determinar la calidad proteínica de la dieta, amerita ciertas consideraciones. Según los conceptos expuestos en este trabajo, el niño desnutrido en vías de recuperación nutricional no es un sujeto adecuado para estudio. Por un lado, su retención nitrogenada varía de manera inversa al grado de recuperación proteínica (5). Por el otro, su crecimiento está influenciado por el grado de deficiencia calórica y proteínica de que está padeciendo, y sus niveles de proteínas séricas dependen no solo de la capacidad de síntesis, sino también de la de catabolismo, así como de las variaciones de su compartimiento metabólico (*pool*), en cuanto a tamaño (6). Si a ello se agrega el hecho de que el niño desnutrido presenta altera-

ciones funcionales digestivas y de composición corporal que se recuperan a distintas velocidades durante su tratamiento (7), es obvio que la interpretación de resultados es no solo difícil sino aventurada. Todo esto se traduce en una mayor variabilidad de los resultados, y ello constituye un fuerte argumento en contra del empleo del niño desnutrido como sujeto en pruebas de esta índole.

En el humano, los métodos de empleo más común para evaluar la calidad de una proteína son los estudios de crecimiento y de balance de nitrógeno, técnica esta última que puede aplicarse a sujetos de todas las edades. Algunos investigadores han utilizado también como método de evaluación la capacidad de inducir recuperación en niños severamente desnutridos, juzgando la calidad de la proteína con base en la mejoría clínica, los cambios en peso y la velocidad de recuperación en los niveles de proteínas y de albúminas séricas. A continuación se describe cada uno de estos métodos, ilustrándolos con ejemplos en cuanto a su uso, y comentando sus ventajas y limitaciones.

A. Estudios de Crecimiento

En los niños, el crecimiento puede estimarse de manera global por medio del incremento en peso. El tiempo necesario para poder valorar con exactitud los cambios ponderales varía en proporción inversa a la velocidad de crecimiento. Así, en niños menores de un año estudiados bajo las condiciones que privan en una sala metabólica y cuyo peso se mide diariamente, su velocidad de ganancia ponderal puede definirse a través de estudios de dos a tres semanas de duración (8, 9). En cambio, en los de edad preescolar, el tiempo requerido para obtener cambios significativos puede ser proporcionalmente mayor.

1. Condiciones experimentales

Estas varían según el propósito del estudio. Basados en el concepto de que una proteína es de mejor calidad cuando mantiene el crecimiento en niños con menor ingesta proteínica, los estudios de crecimiento pueden diseñarse con miras a definir uno u otro de los siguientes dos puntos.

a) *Edad mínima en la que la ingesta de la proteína bajo prueba mantiene un crecimiento adecuado* - Para determinar este punto es indispensable que los ensayos biológicos en animales indiquen que la calidad proteínica es muy buena.

El principio en que se basa este método de valorar la calidad de una proteína es el que, como ya se expuso, mientras menor es el niño, mayores son sus requerimientos de aminoácidos por unidad de peso. En consecuencia, al determinar la edad mínima en la que una proteína mantiene un crecimiento adecuado, como parte de una dieta que cubra todas las recomendaciones nutricionales, incluyendo los requerimientos de nitrógeno total, se determina la calidad de la

proteína en prueba. Esta será de mejor calidad cuanto menor sea la edad de los niños en quienes se logra mantener un crecimiento adecuado, bajo las condiciones expuestas y siempre que se mantengan fijas dichas condiciones.

Los niños deben ser sanos y permanecer libres de procesos patológicos. Se recomienda iniciar las pruebas en niños de 6 a 9 meses, ya que a esa edad el crecimiento, aunque todavía rápido, es menos acelerado que en los meses previos, y ya su capacidad digestiva está altamente desarrollada. El Cuadro 1 muestra las ingestas de proteína ideal y de calorías que se recomienda para las diferentes edades de niños menores de 1 año (10, 11), así como el incremento esperado en cuanto a peso, el cual se expresa en g/día y en g/kg/día (12).

Si la proteína bajo prueba mantiene el crecimiento en los niños de 6 a 9 meses de edad, puede procederse al estudio de otros de menor edad hasta llegar - en el caso de alimentos diseñados para reemplazar la leche materna - a recién nacidos y aún a prematuros.

Durante todo el ensayo la ingesta nutricional debe ser medida muy cuidadosamente y ser constante en base al peso.

b) *Cantidad mínima de proteína capaz de mantener el crecimiento* - Para este tipo de ensayo la proteína bajo prueba debe ser también la única fuente de nitrógeno, siendo necesario iniciarla con una ingestión proteínica basada en las recomendaciones nutricionales de FAO/OMS (10) para niños de la edad en estudio. Luego, dicha ingesta debe reducirse paulatinamente en cantidades que no excedan de 0.25 g de proteína/kg/día, siempre manteniendo una ingesta proteínica superior a los requerimientos de proteína ideal. Cada nivel proteínico debe mantenerse por un período de 2 semanas, conservando constante y a niveles adecuados (13) el resto de la ingesta de nutrientes.

2. Precauciones generales

De fundamental importancia es el registro cuidadoso de la ingesta y de las alteraciones que acuse la salud de los niños, muy particularmente los trastornos gastrointestinales y las infecciones.

En todos los estudios de crecimiento debe existir un grupo muy bien controlado de niños en quienes se ha obtenido respuesta de crecimiento al administrarles proteínas de referencia de conocida calidad biológica, como son la leche o la harina de huevo. Por lo tanto, es también altamente recomendable estudiar simultáneamente un grupo control que reciba una proteína de referencia, siguiendo un plan experimental idéntico al que se emplea con la fuente proteínica bajo prueba.

3. Ventajas de los estudios de crecimiento

a) Bajo condiciones estrictas y altamente estandarizadas, los estudios de crecimiento ponderal pueden

CUADRO 1

Peso, incrementos ponderales y requerimientos proteínicos y calóricos de niños lactantes

Edad meses	Peso ideal*		Ganancia ponderal*			Requerimientos**		
	Niños	Niñas	Niños	Niñas	Ambos sexos	Proteínicos g/kg/día	Calóricos	Cal/kg/día
0	3.40	3.40	28.3	26.6	8.1	2.50	3.00	?
1	4.25	4.20	28.3	25.0	6.3	2.30	2.75	120
2	5.10	4.95	25.0	21.6	4.6	2.10	2.50	120
3	5.85	5.60	21.6	20.0	3.7	1.95	2.35	120
4	6.50	6.20	21.6	18.3	3.1	1.80	2.20	110
5	7.15	6.75	18.3	18.3	2.6	1.70	2.05	110
6	7.70	7.30	16.6	16.6	2.2	1.60	1.90	110
7	8.20	7.80	16.6	16.6	2.1	1.50	1.80	110
8	8.65	8.30	15.0	15.0	1.8	1.40	1.70	110
9	9.05	8.75	13.3	13.3	1.5	1.30	1.55	110
10	9.45	9.15	11.6	11.6	1.2	1.20	1.45	100
11	9.80	9.50	8.3	8.3	0.9	1.10	1.30	100
12	10.05	9.75	8.3	8.3	0.8	1.00	1.20	100

* Extrapolado de los valores correspondientes al 50 percentilo de Stuart y Stevenson (12).

** Requerimientos proteínicos extrapolados a partir de los requerimientos proteínicos de proteína ideal establecidos por FAO/OMS (10). Las necesidades calóricas son también las adoptadas por la FAO (11).

aportar datos cuantitativos de relación directa con la calidad de la proteína.

b) Los cambios en peso son fáciles de medir.

4. Desventajas y limitaciones de los estudios de crecimiento

a) El crecimiento es un fenómeno sumamente complejo que implica aumentos en compartimientos corporales muy distintos, incluyendo un franco incremento en tejido adiposo, sobre todo en el niño durante el primer año de vida (14). En este sentido, la ingesta calórica deberá mantenerse a un nivel constante en la ingestión diaria de los niños bajo estudio.

b) Por las razones expuestas, la variabilidad en crecimiento ponderal como respuesta a una proteína dada - además de la variabilidad ocasionada por la proteína misma - está sujeta a las variaciones de requerimientos calóricos de cada niño, los cuales cambian dentro de un margen relativamente amplio (15).

c) Durante el período de estudio pueden ocurrir cambios en la composición corporal del niño sin que éstos se manifiesten en cambios ponderales, o bien pueden presentarse ganancias de peso, pero debidas solamente a un incremento en grasa. En este caso, el crecimiento no refleja la calidad proteínica. La Gráfica 1 muestra un ejemplo de lo expuesto, en un niño preescolar.

Conviene subrayar que estos estudios deben llevarse a cabo bajo condiciones altamente estandarizadas, con niños sanos y normales en términos de crecimiento; que no estén en una fase de recuperación nutricional en la cual puede ocurrir un crecimiento mayor al normal, y que la única fuente de nitrógeno debe ser la proteína de prueba.

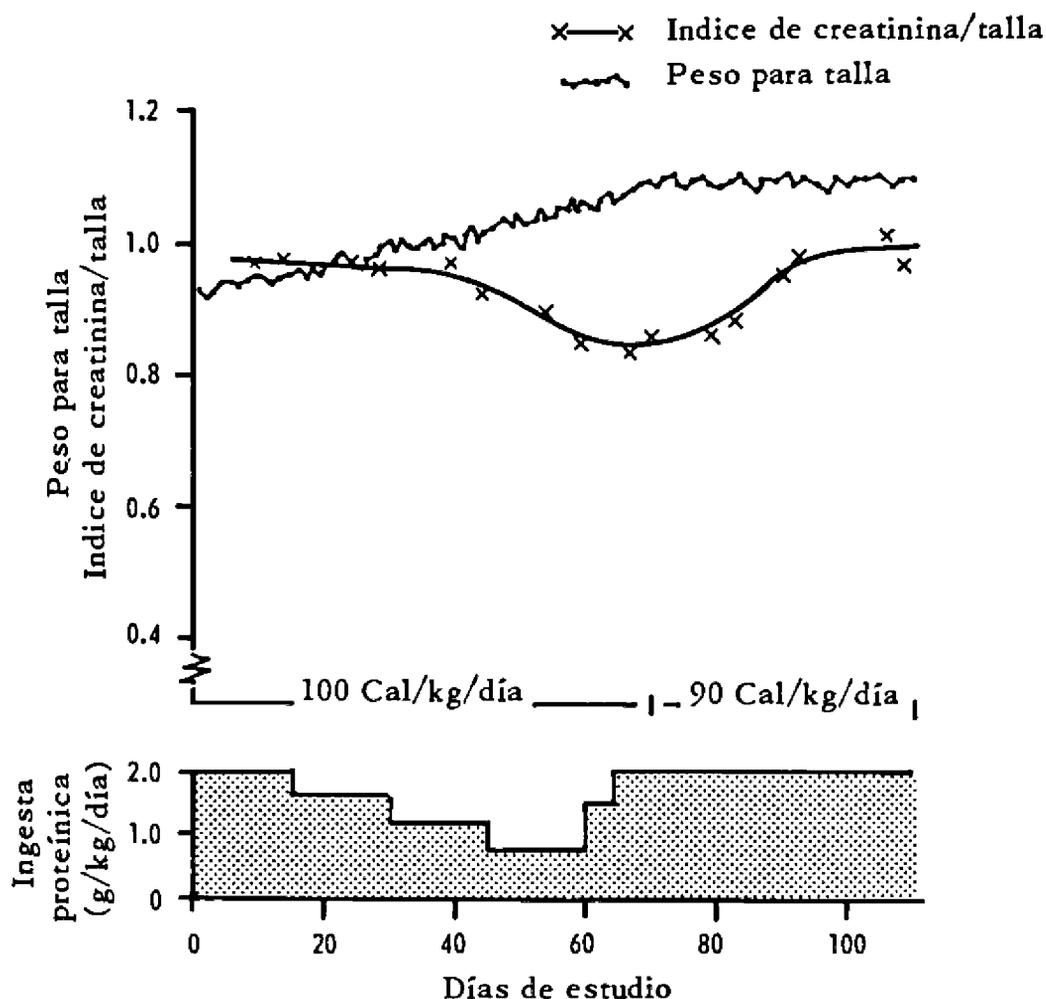
B. Estudios de Balance de Nitrógeno

Existen diversos métodos para evaluar la calidad de una proteína empleando la técnica de balance de nitrógeno. Esta última tiene la ventaja de que mide específicamente una función directamente relacionada con el nivel de ingesta y la calidad de la proteína. Al igual que en las pruebas de crecimiento - y debido a la variabilidad biológica del ser humano - todos los ensayos deben efectuarse siguiendo estrictamente un protocolo muy estandarizado. Ajeno al diseño experimental, la técnica de balance de nitrógeno tiene los requerimientos comunes que a continuación se detallan.

1. Características de los niños

Todo niño que entra a formar parte de un estudio orientado a determinar la calidad proteínica de un alimento, debe satisfacer todas y cada una de las condiciones siguientes:

Niño de 2 años, 8 meses



GRAFICA 1

Cambios en peso y en ICT observados en un niño sometido a ingestas diferentes de una fuente constante de proteína. Se demuestran cambios en composición corporal consecutivos tanto a la ingesta proteínica como calórica, no reflejados por cambios en peso.

a) Estar sano, en base a evaluaciones clínicas seriadas y a su velocidad de crecimiento; b) no tener deficiencias nutricionales a juzgar por exámenes clínicos, condición hematológica, determinaciones bioquímicas específicas, peso para talla por arriba de 95% basado en el 50 percentilo de las tablas de Stuart y Stevenson (12) u otras adecuadas, y su índice de creatinina/talla debe exceder de 0.90 (5, 16); c) mantenerse libre de infecciones o diarrea durante las pruebas, y d) estar adaptado a las técnicas de balance y a recibir el tipo de dieta a emplearse en el estudio. En el caso del Centro Clínico del INCAP, donde se reciben niños severamente desnutridos, las condiciones citadas asumen particular importancia. La Figura 1 muestra la apariencia

de un niño malnutrido y ya totalmente recuperado, y la Gráfica 2, el registro de su crecimiento mientras estaba hospitalizado.

13 de marzo de 1964

2 de junio de 1964



FIGURA 1

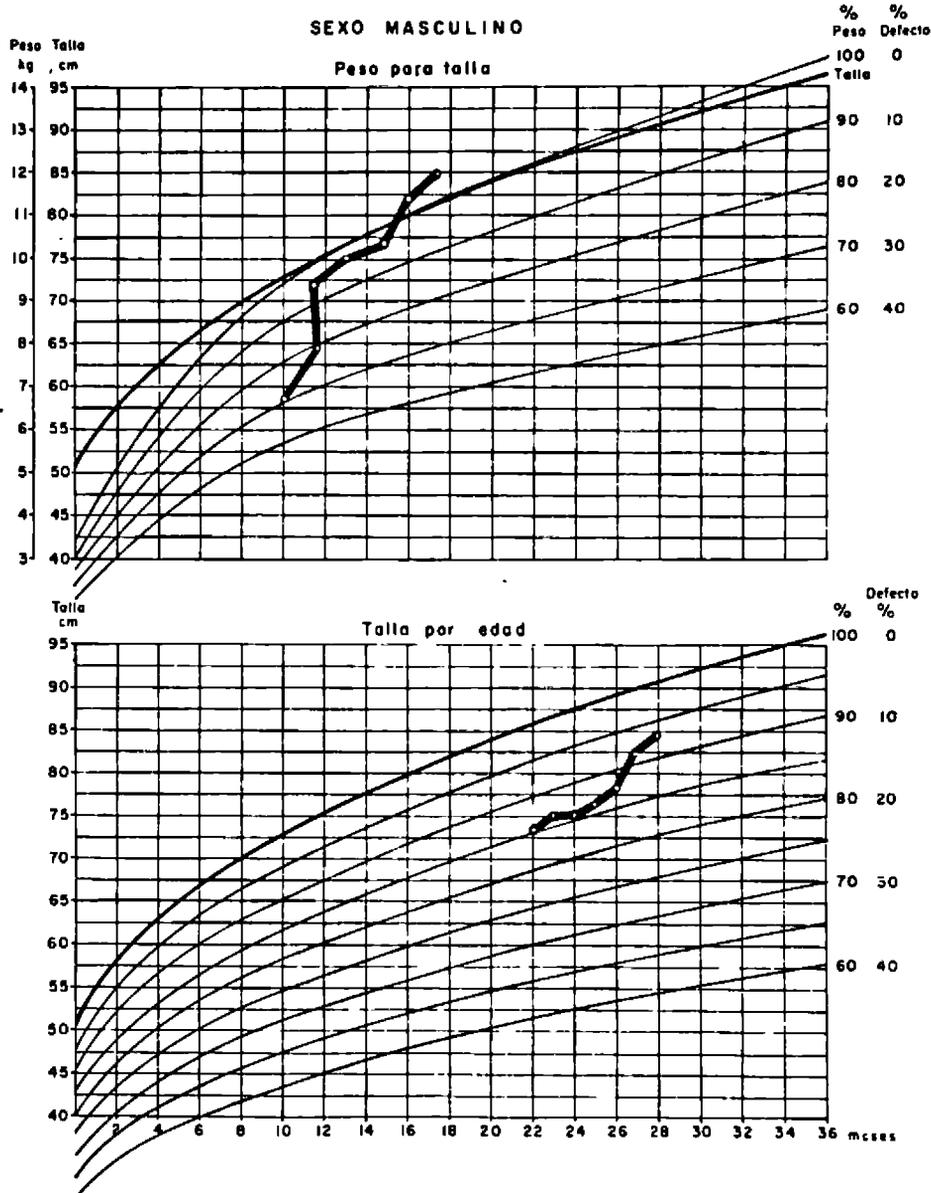
Niño malnutrido y ya totalmente recuperado.

2. Características de las dietas

Todas las dietas deben prepararse en una cocina metabólica donde los ingredientes sean pesados con la máxima exactitud práctica. En la cocina metabólica del INCAP los ingredientes se pesan con una exactitud de 0.1 g y se cocinan por 15 minutos en forma líquida. Las dietas, con el agregado de suplementos, aportan de manera constante las cantidades recomendadas de minerales, vitaminas, calorías y agua, a lo largo de todo el estudio. Para niños comprendidos entre los 18 meses y 5 años de edad, la ingesta calórica varía en-

tre 100 y 80 calorías/kg/día, manteniéndose constante a un nivel que permita el crecimiento; de esta manera la ingesta calórica en ningún momento es limitante. La ingesta de agua varía entre 120 y 150 mililitros/kg/día y también se mantiene constante en cada niño. En cuanto a la ingesta calórica total, el 20% es provisto en forma de grasa, incluyendo la que contiene el alimento de prueba. Para alcanzar los niveles calóricos indicados, y en los casos en que ello es necesario, se agrega almidón, sucrosa y/o dextrinomaltosa como fuente de carbohidratos, y aceite de maíz como fuente de grasa. Durante el estudio, la única variable en las dietas es la fuente o el nivel de proteína, según lo exija el diseño experimental a seguir.

PC 152



GRAFICA 2

Registro de crecimiento del niño que aparece en la Figura 1, durante su hospitalización en el Centro Clínico del INCAP.

3. Técnicas de balance metabólico

Por lo general, la ingesta dietética es constante, durante 10 a 13 días, de los cuales los primeros cuatro constituyen un período de adaptación, ya sea para una nueva fuente proteínica a un nivel de nitrógeno constante, o para un nuevo nivel de ingesta proteínica, manteniéndose la fuente invariable. A este período de adaptación siguen dos o tres más, de tres días cada uno, en el curso de los cuales se colectan, por separado, orina y heces. Estos constituyen los períodos de balance de nitrógeno. Para obtener una máxima exactitud, tanto en la medición de ingesta como en las colecciones de excreta, se adoptan precauciones extremas. Si el niño tiene control sobre sus esfínteres se le permite deambular; de lo contrario se le mantiene en una cama metabólica durante los períodos de colección de excreta. El de orina está controlado en tiempo, y el de heces por medio de marcadores.

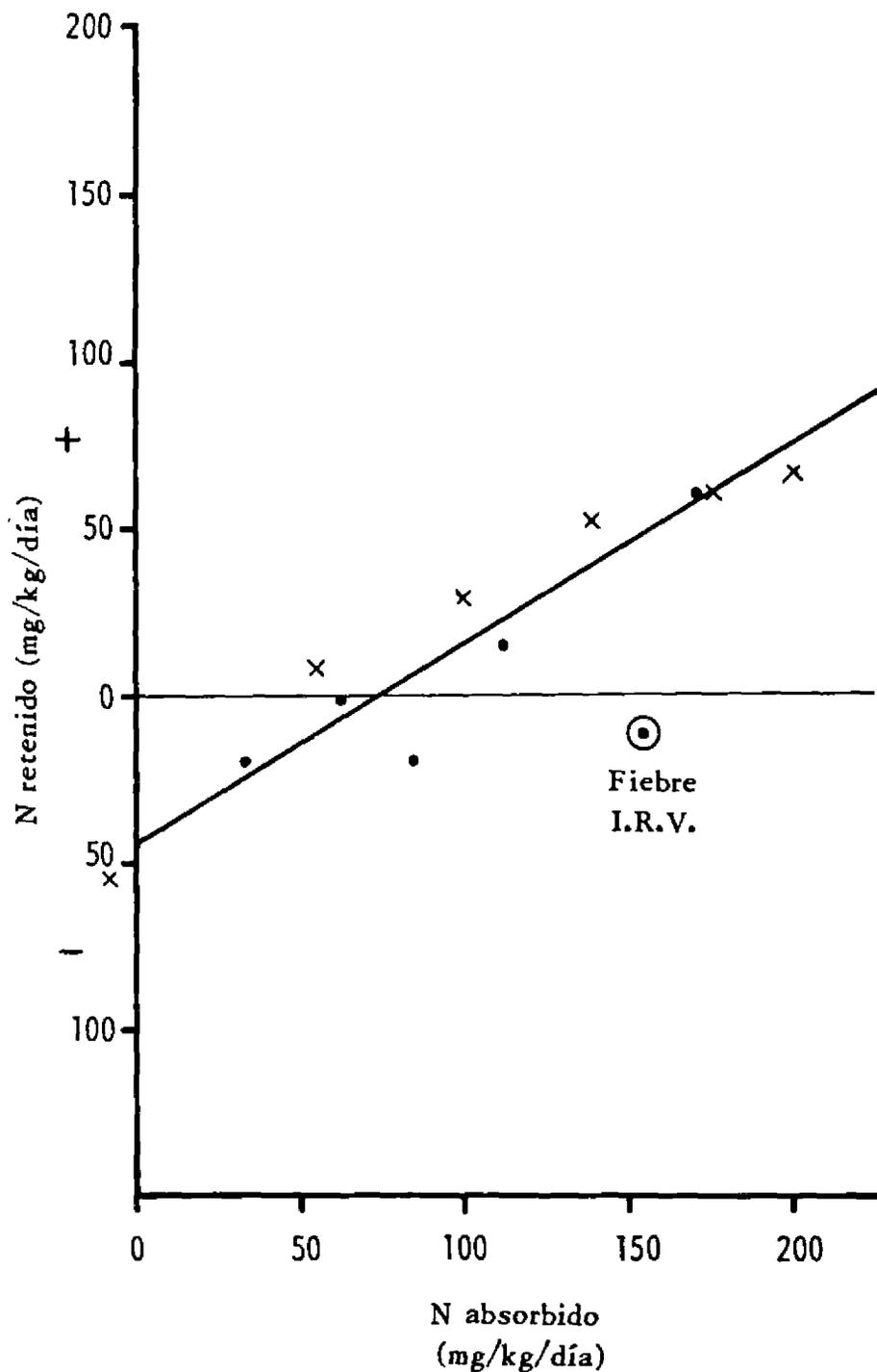
Se analizan muestras representativas homogeneizadas de la dieta, y de orina y heces para determinar su contenido total de nitrógeno por el método de macro Kjehldal (17). Simultáneamente se determina creatinina urinaria (18) en cada período de colección, y cada cierto tiempo se toman muestras de sangre para determinaciones de volumen corpuscular por medio del microhematocrito y para establecer valores de las proteínas y albúminas séricas.

4. Cuidado de los niños

Diariamente se somete a examen a los niños, y se les toma la temperatura por lo menos tres veces al día y cuando se considere necesario. Se pesan y se les lleva un registro diario de ingesta y excreta, que incluye peso fecal, características de las heces y peso y volumen urinario, anotándose la presencia de cualquier alteración en el niño, así como su comportamiento diario. Si hay vómito, éste se pesa y se trata de obtener una alícuota para análisis de su contenido de nitrógeno. En caso de ocurrir diarrea o infecciones, el estudio se suspende o después de que ha pasado el episodio patológico se agregan períodos de colección adicionales.

La importancia de esta metodología se aprecia al observar la influencia que estas variables ejercen sobre la retención de nitrógeno. La Gráfica 3 muestra la correlación entre la retención de nitrógeno* y el grado de deficiencia proteínica medida por el índice de creatinina/talla (5). Los niños con deficiencia de proteína retienen más nitrógeno que aquéllos con repleción total de este nutriente. Tal hecho asume

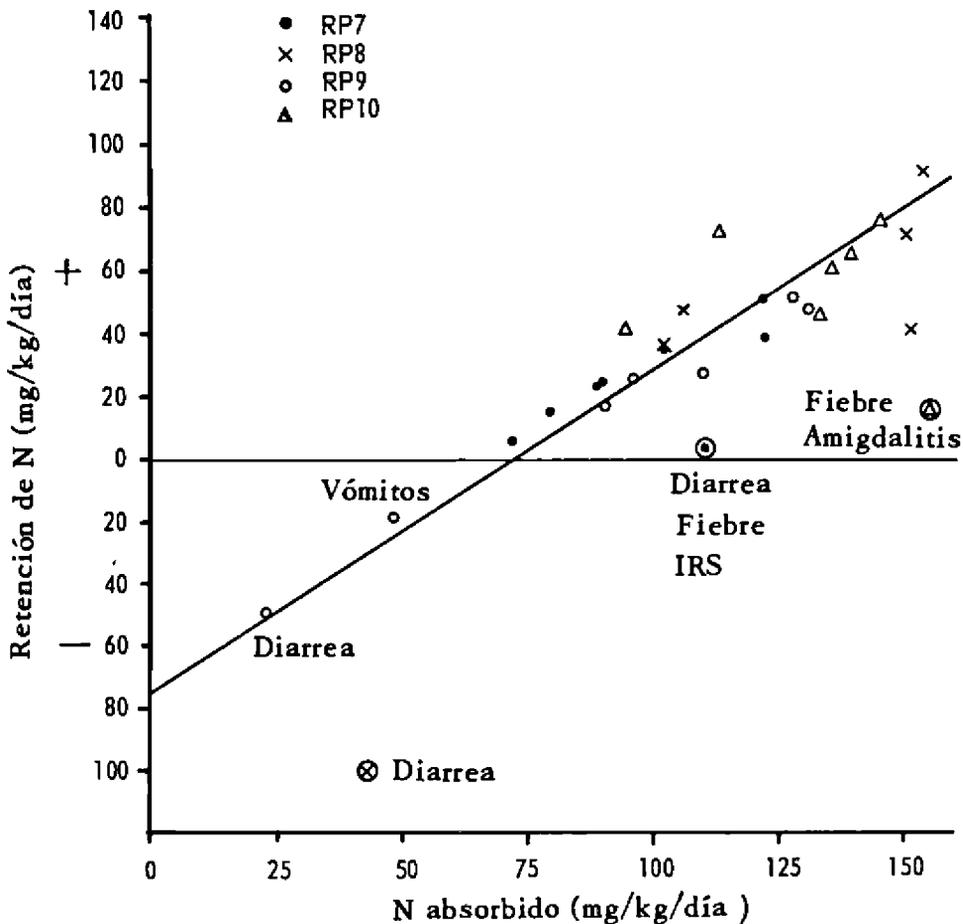
* En este trabajo, N retenido es el resultado de restar de la ingesta de nitrógeno (N) el N excretado en heces y orina; así, N absorbido es el N ingerido menos el N fecal. Según se observa más adelante, estos N en realidad son aparentemente retenidos y absorbidos, ya que no toman en cuenta los N endógenos ni la pérdida tegumentaria de este elemento.



GRAFICA 4

Efecto de un proceso respiratorio viral, con fiebre, sobre la retención de nitrógeno.

cuencia y debido a una mayor excreción fecal, también afecta la retención de nitrógeno a través de una serie de mecanismos que no se comentan en este trabajo. La Gráfica 5 proporciona un ejemplo en el que la retención de nitrógeno se encuentra disminuida como consecuencia de diarrea y otras infecciones.



GRAFICA 5

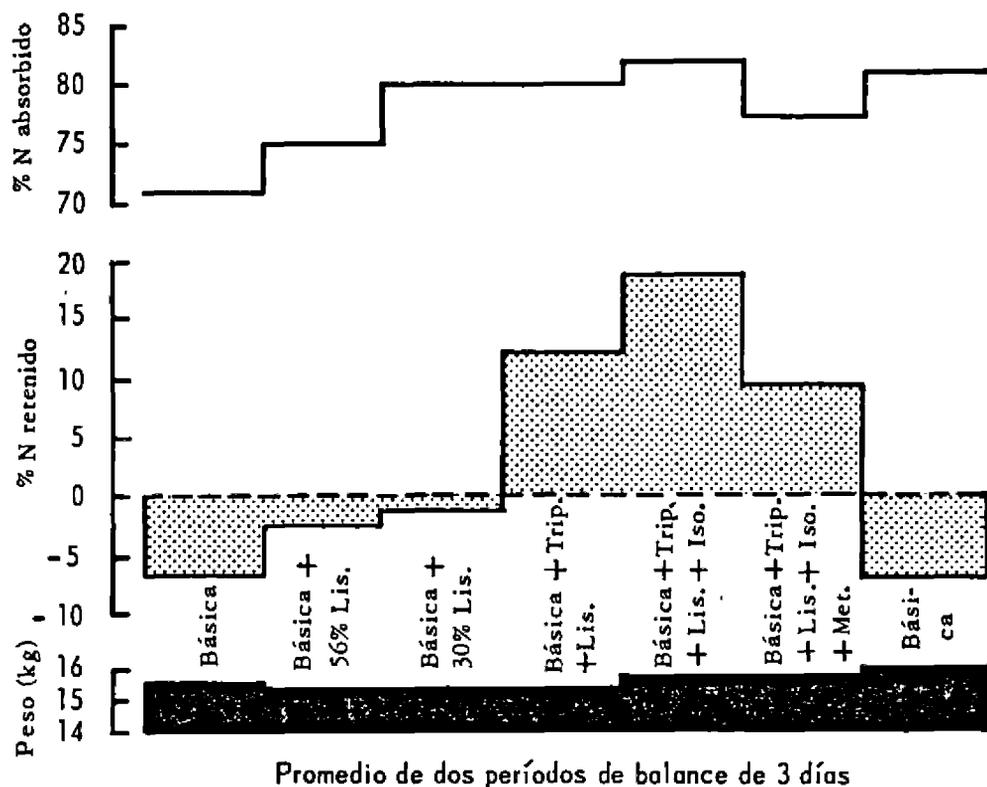
Efecto de la diarrea y otras infecciones sobre la retención de nitrógeno.

Un hallazgo común es que los niños presenten cierto grado de intolerancia a cualquier dieta cuando el contenido proteínico de ésta es bajo en relación a su contenido calórico. Dado que la anorexia es frecuente en estas condiciones, cuando a los niños se les somete a dietas que contienen de 0.5 a 1 g de proteína/kg de peso corporal, éstas deben ser administradas con paciencia. La presencia de vómitos se registra cuidadosamente, lo mismo que su contenido de nitrógeno, el que se substrahe del N ingerido por el niño. Si hay vómitos recurrentes, el estudio debe discontinuarse no solo por razones de ética sino también debido a que, en estas circunstancias, los resultados del balance de nitrógeno son poco confiables.

Diseños Experimentales

Con el fin de someter a prueba la calidad de una proteína empleando el método de balance de nitrógeno, se puede aplicar diversos diseños experimentales. La condición general es que la única variable sea la fuente o el nivel del nitrógeno de la dieta. Por este motivo, dos son los diseños generales:

a) *Diseño experimental en el que la variable es la fuente de nitrógeno* - Este requiere un nivel constante en la ingesta de nitrógeno. Los períodos de balance se hacen en secuencia, comparando la fuente de N bajo prueba, con una proteína de referencia (leche o huevo total), o con una fuente proteínica conocida. El uso de este diseño experimental en la determinación del efecto de suplementación de aminoácidos sobre el valor nutritivo de la proteína de maíz, se aprecia en la Gráfica 6 (19).



Tomada de: Bressani, R., N. S. Scrimshaw, M. Béhar, y F. Viteri (19).

GRAFICA 6

Absorción y retención de nitrógeno, y cambios de peso observados en un niño recién recuperado de DPC, alimentado con leche o con una dieta básica de masa de maíz suplementada gradualmente con aminoácidos.

En los estudios en que se utiliza este diseño, la proteína de calidad inferior obviamente producirá una menor retención de nitrógeno. Es importante tener en cuenta que la proteína que se administre inmediatamente después de la de menor calidad biológica producirá una retención de nitrógeno mayor que la real; esto sucederá como consecuencia de la baja retención de N que ocurrió en el período previo. Varios investigadores (20) han utilizado la magnitud del incremento en retención de nitrógeno que ocurre al usar una proteína de mejor calidad, como prueba muy sensible del valor relativo de diversas fuentes de nitrógeno.

El diseño experimental bajo discusión es muy útil siempre que los niveles de ingesta total de nitrógeno se restrin-

jan a un área cercana a los requerimientos proteínicos del sujeto en estudio; conviene recordar, sin embargo, que dentro de esos niveles de ingesta, mientras menor sea ésta mayor será la diferencia entre dos fuentes de nitrógeno de distinta calidad. De aquí que para lograr resultados cuantitativos y comparables de una proteína a otra, las condiciones del experimento - sobre todo el nivel de ingesta proteínica - deben ser constantes. No menos importante, el diseño experimental debe seguirse rigurosamente tomando en consideración los efectos de interacción causados por la secuencia de la fuente proteínica.

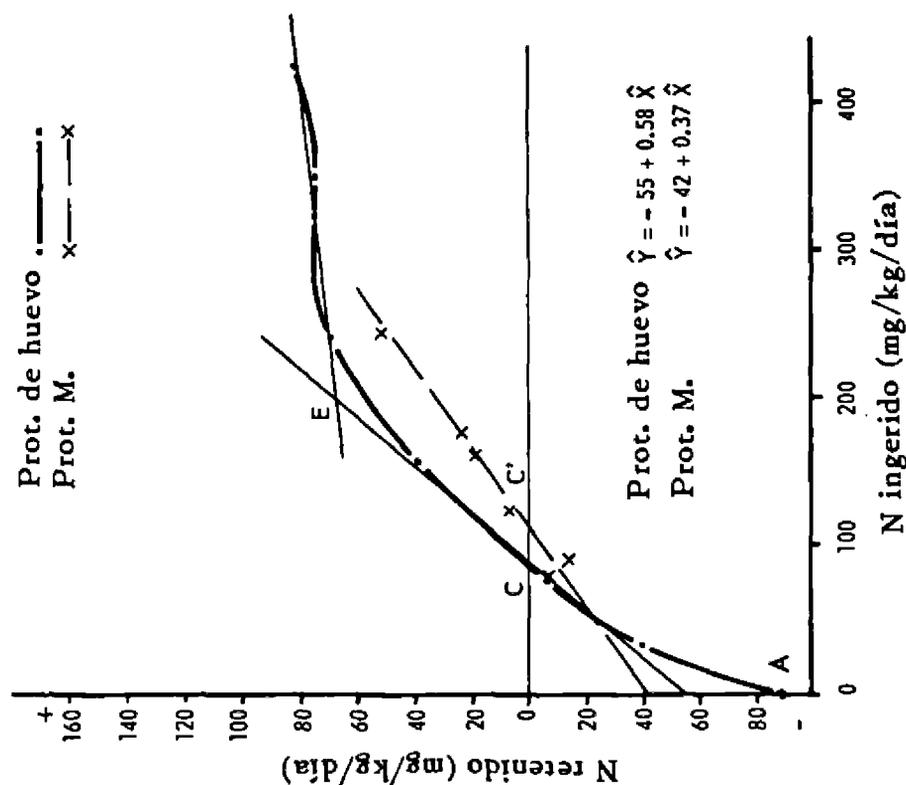
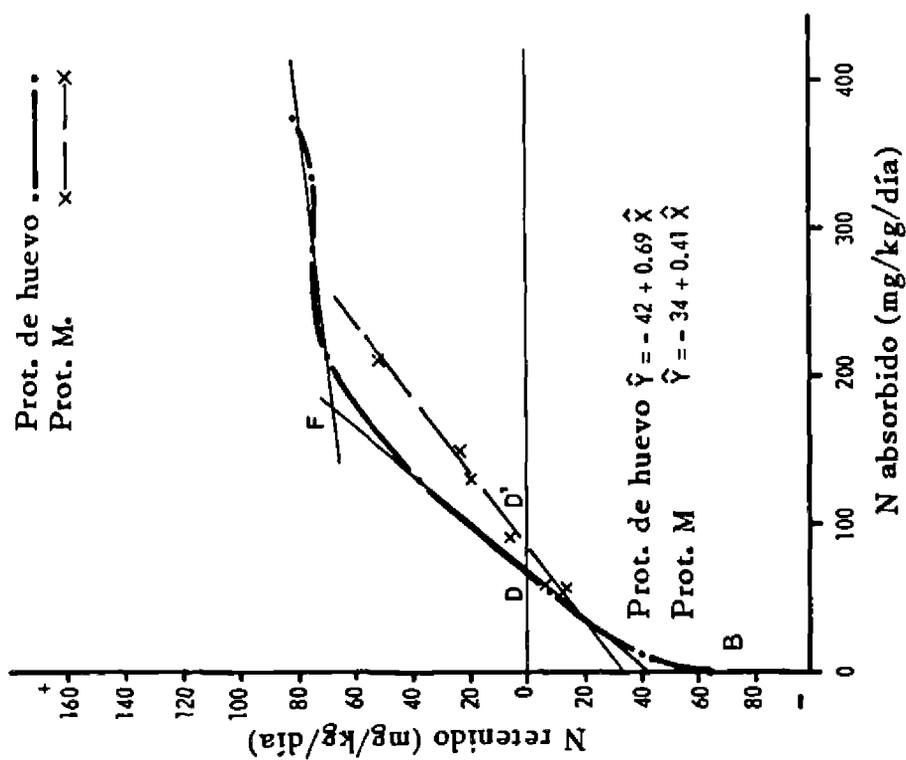
b) *Diseño experimental en el que la variable es la cantidad de nitrógeno de una fuente constante* - Este constituye el índice de balance nitrogenado (21), y ha sido usado para valorar la calidad de la proteína de nuevas fuentes de este nutriente, utilizando como punto de referencia los resultados obtenidos con proteína de huevo total y de leche. En este caso, cada niño recibe cuatro o más niveles diferentes de proteína, aplicándose cada nivel durante un período de 10 a 13 días. El primer nivel de ingesta proteínica es de 1.5 g/kg/día, y a éste siguen sucesivamente, ingestiones de 1.0, 0.75 y 0.50 g/kg/día.

El nitrógeno retenido en cada período de balance se correlaciona ya sea con el nitrógeno ingerido o con el absorbido (N ingerido menos N fecal). La Gráfica 7 muestra el principio en el que se basa la evaluación de la calidad proteínica de diversas fuentes. En el lado izquierdo se presenta la curva del nitrógeno retenido en relación al ingerido, ambos en mg/kg/día, siendo el huevo íntegro la fuente de proteína (línea gruesa y puntos) o una mezcla de proteínas (Prot. M) predominantemente de origen vegetal (línea interrumpida y X).

La línea que se inicia en el punto A, obtenida con proteína de huevo, puede dividirse en tres segmentos: 1) el primero en el que la ingesta proteínica es muy baja y en donde el incremento en la retención de nitrógeno es muy alta por unidad de ingesta, dando así una pendiente cercana a 90°.

Según se dijo, este primer segmento se inicia en el punto A que corresponde al nitrógeno endógeno urinario y fecal determinado en niños con una dieta libre de nitrógeno, y termina aproximadamente cuando la ingesta de N alcanza 35 mg/kg/día. 2) El segundo segmento corresponde a ingestiones de 35 y 200 mg de N/kg/día, y a través del mismo puede trazarse una línea recta de regresión que presenta una pendiente menor a la del primer segmento. 3) El último segmento se inicia a ingestiones superiores a 200 mg de N/kg/día, en cuyo caso el incremento en la retención de nitrógeno por unidad de ingestión es muy bajo y a través del cual puede trazarse una línea de regresión que tiende a lo horizontal. Esta línea corta la correspondiente al segundo segmento en el punto E, que para la proteína del huevo corresponde a una ingestión cercana a 200 mg de N/kg/día.

A la derecha de la misma Gráfica se muestra el nitrógeno retenido por unidad de nitrógeno absorbido, ambos expre-



GRAFICA 7

Índice de balance nitrogenado.

sados en términos de mg/kg/día. Los mismos comentarios expuestos en párrafos anteriores aplican a la línea obtenida con la proteína de huevo, que se origina en el punto B, que representa la excreción endógena de nitrógeno urinario. Aquí también puede trazarse una línea recta a través del segundo segmento, esto es, entre 30 y 160 mg de N absorbido/kg/día, al igual que a través del segmento 3, de retención de nitrógeno esencialmente estable a pesar del incremento en nitrógeno absorbido. El punto F a la derecha de esta Gráfica corresponde al punto E de la parte izquierda.

En la misma Gráfica 7 se observa que la línea recta de regresión trazada a través del segundo segmento, además de una pendiente claramente definida, tiene otras tres características. Estas son: a) cruza la línea de equilibrio nitrogenado (retención de nitrógeno = 0) en los puntos C y D, formando un ángulo cuya tangente representa la pendiente de la línea. b) Intercepta la línea de nitrógeno ingerido o absorbido (= 0) en un punto más alto que el obtenido experimentalmente con dietas libres de nitrógeno (puntos A y B). Este último fenómeno ha sido observado previamente por otros investigadores (22, 23), y sugiere que, por razones hasta ahora no del todo esclarecidas, cuando la ingestión de nitrógeno es muy baja la contribución del nitrógeno endógeno a la pérdida de N es menor de la que se obtiene usando dietas libres de este elemento. c) Por último, cruza la línea trazada a través del tercer segmento, definiendo los puntos E y F. Los puntos C, D, E, y F, así como la pendiente del segundo segmento, son características del índice de balance de nitrógeno que pueden ser empleadas para evaluar comparativamente la calidad proteínica.

En teoría, mientras mejor es la calidad de la proteína, más grande será la tangente del ángulo (el coeficiente de regresión será más alto y la pendiente más vertical), y los puntos C, D, E y F estarán a niveles inferiores, tanto de ingesta de nitrógeno como de absorción del mismo.

La pendiente de la línea de regresión entre el N retenido y el N absorbido constituye una aproximación al valor biológico de la proteína bajo prueba.

Idealmente, los puntos C y D ya descritos, deberían ser directamente proporcionales a la pendiente. Sin embargo, a causa de la falta de linealidad entre retención e ingesta de nitrógeno cuando éstas son muy bajas (24), y posiblemente debido también a variaciones biológicas en cuanto al nitrógeno endógeno (25), estos puntos varían de los predichos cuando la línea de regresión se inicia en los puntos A o B, que corresponden al promedio de la excreción del N endógeno. Estas características de los puntos C y D limitan su valor. No obstante, se considera que el punto C - definido como la cantidad de nitrógeno ingerido que se requiere para obtener equilibrio nitrogenado (retención de nitrógeno = 0) - tiene un significado práctico, y cuando se expresa en términos relativos, puede contribuir a la evaluación de la calidad proteínica. Ciertas pequeñas diferencias en la pendiente de la línea de regresión y en la intercepta en el punto B, hacen que el punto D varíe sin ninguna relación a los otros métodos

de evaluación de la proteína. Por consiguiente, el punto D no tiene carácter discriminatorio.

Los puntos E y F representan el sitio donde el metabolismo de nitrógeno del niño cambia, de una eficiencia máxima de utilización, a una subóptima.

A partir de los criterios expuestos, la proteína M (Gráfica 7) es de calidad inferior a la proteína de huevo, por las razones siguientes: a) los coeficientes de regresión son más bajos, y b) los puntos C' y D' se alcanzan con valores de N más altos en las abscisas. Los puntos correspondientes a E y F de la proteína de huevo no pueden ser calculados para la proteína M a partir de estos datos. Dichos puntos no se obtuvieron por razones de orden práctico, como son: i) la necesidad de utilizar por lo menos tres niveles de ingesta de nitrógeno por arriba de 240 mg/kg/día, lo cual prolongaría el estudio; ii) cuando se usan dietas que contienen proteínas vegetales, el volumen de alimento a menudo establece un límite de tolerancia a estas preparaciones, en los niños, y iii) los puntos E y F no siempre son claramente definibles, en particular cuando la proteína no es de calidad óptima.

El método del índice de balance nitrogenado es ampliamente reproducible si se sigue de manera estricta. Los resultados que se muestran en el Cuadro 2, el cual contiene el ajuste de las ecuaciones de regresión lineal a los datos obtenidos con diversas proteínas, y los coeficientes de correlación para esas mismas proteínas, corroboran esta afirmación. Para la regresión de los segmentos 1 y 2 se ha probado una ecuación cuadrática, pero ésta no ha mejorado el ajuste de la regresión lineal.

CUADRO 2

Variabilidad del índice de balance de nitrógeno elaborado con base en ecuaciones de regresión y sus coeficientes de correlación

Fuente proteínica	D.E. para diferentes niveles de N ingerido (mg/kg/día)				Coeficiente de correlación
	50	100	150	200	
S. M.	3.7	2.5	1.9	2.3	0.935
S. A.	3.5	2.1	1.7	2.1	0.944
T. L.	3.0	2.0	1.5	2.0	0.956
I. L.	4.6	3.0	2.2	3.0	0.932

Fuente proteínica	D.E. para diferentes niveles de N absorbido (mg/kg/día)				Coeficiente de correlación
	50	100	150	200	
S. M.	2.9	1.9	2.1	3.2	0.940
S. A.	2.2	1.4	2.0	3.3	0.960
T. L.	1.5	1.0	1.4	2.2	0.981
I. L.	3.2	2.1	3.0	4.8	0.939

D.E. = Desviación Estándar.

5. Ventajas de los estudios de balance de nitrógeno

a) La retención de nitrógeno es una función que depende de la calidad y cantidad de la proteína ingerida, si el resto de la dieta es adecuada y constante, y si el sujeto está en un estado estable. Por lo tanto, los resultados de balances de nitrógeno efectuados bajo condiciones estandarizadas - ya que reflejan directamente la calidad proteínica - son directamente comparables. El empleo del índice de balance nitrogenado salva uno de los obstáculos que presenta el uso de estos métodos, o sea la relación existente entre la ingestión y la retención de nitrógeno.

b) Su empleo facilita la ejecución de estudios repetidos en secuencia rápida en el mismo sujeto, con lo que se reduce la variabilidad biológica.

c) Las técnicas de balance pueden aplicarse a sujetos de cualquier edad.

6. Desventajas y limitaciones de los estudios de balance de nitrógeno

a) Requieren la disponibilidad de instalaciones y equipo adecuados, así como de personal entrenado.

b) Fácilmente se cometen pequeños errores en la medición de la ingesta y excreta de nitrógeno que, con frecuencia, tienen un efecto aditivo.

c) Existen vías de pérdida de nitrógeno, particularmente por el sudor y los tegumentos, que constituyen una proporción no medible por los métodos usuales. Estas pérdidas son importantes si se trata de estudios prolongados (26) y cuando hay sudoración significativa (27).

d) Los estudios metabólicos en niños menores de 3 años prácticamente se restringen al sexo masculino por dificultades en coleccionar orina por períodos prolongados en niñas que aún no controlan sus esfínteres.

7. Resultados obtenidos con el empleo de esta metodología

El Cuadro 3 muestra la digestibilidad aparente y verdadera de diversas proteínas cuyo valor biológico ha sido sometido a prueba usando este método. Se dan a conocer, asimismo, los coeficientes de regresión entre la retención de nitrógeno y ambos - N ingerido o absorbido - y la ingestión de N necesaria para obtener equilibrio nitrogenado con cada una de las mezclas proteínicas estudiadas. Como proteínas de referencia se emplearon la de leche y la de huevo. Según se observa, para la proteína de huevo se presentan dos valores, cada uno de los cuales corresponde a un experimento distinto. El experimento (B) para proteína de huevo se utilizó como referencia para la evaluación de las otras proteínas, porque dicha prueba se llevó a cabo cuando los autores del presente trabajo contaban ya con mayor experiencia en el uso de este método.

Índice de balance nitrogenado de proteínas de diversas fuentes (expresado en términos de valores absolutos)

Fuente de proteína	Digestibilidad		Coeficiente de regresión		N retenido = 0 obtenido con	
	Aparente	Verdadera*	Y = nitrógeno retenido			
			\bar{x} Nitrógeno ingerido mg/kg/día	\bar{x} Nitrógeno absorbido mg/kg/día		
Leche íntegra**	82	92	0.64	0.73	84	56
Huevo íntegro (A)**	79	98	0.58	0.69	90	70
Huevo íntegro (B)**	71	91	0.59	0.80	94	65
S. M.	77	94	0.37	0.41	115	82
S. A.	70	86	0.40	0.51	88	55
T. L.	71	88	0.47	0.58	80	48
I. L.	68	85	0.48	0.58	90	53
Mezcla Vegetal INCAP 9	68	84	0.35	0.49	100	60
Mezcla Vegetal INCAP 14	74	91	0.59	0.62	92	60
Mezcla Vegetal INCAP 15	74	92	0.43	0.47	113	78

* Se resta el promedio de nitrógeno endógeno fecal.

** Calculado a partir de los balances con nitrógeno absorbido < 160 mg/kg/día.

Es fácil apreciar que en los valores relativos de cada uno de estos criterios de discriminación para la misma proteína existen variaciones ya que, en parte, tales valores dependen también de la proteína de referencia escogida para el ensayo. Por lo tanto, para fines prácticos, y conscientes de las limitaciones de cada valor individual, para cada proteína se ha calculado un puntaje compuesto que consiste en el promedio de los tres valores ya discutidos: a) pendiente de la línea entre N retenido y N ingerido; b) pendiente de la línea entre N retenido y N absorbido, y c) N ingerido necesario para lograr equilibrio nitrogenado. Los resultados de este puntaje compuesto, expresados como por ciento del puntaje de la proteína de leche o de la proteína de huevo, se dan a conocer en el Cuadro 4.

CUADRO 4

Puntaje compuesto basado en los coeficientes de regresión entre N retenido y N ingerido y absorbido, y el nivel de N ingerido, necesario para obtener equilibrio nitrogenado (datos obtenidos del índice de balance nitrogenado)

Fuente de proteína		Puntaje	Fuente de proteína		Puntaje
Leche	=	100	Huevo	=	100
Huevo	=	97	Leche	=	104
M. V. 9	=	69	M. V. 9	=	71
M. V. 14	=	89	M. V. 14	=	93
M. V. 15	=	68	M. V. 15	=	72
S. M.	=	62	S. M.	=	65
S. A.	=	76	S. A.	=	80
T. L.	=	86	T. L.	=	90
I. L.	=	82	I. L.	=	86

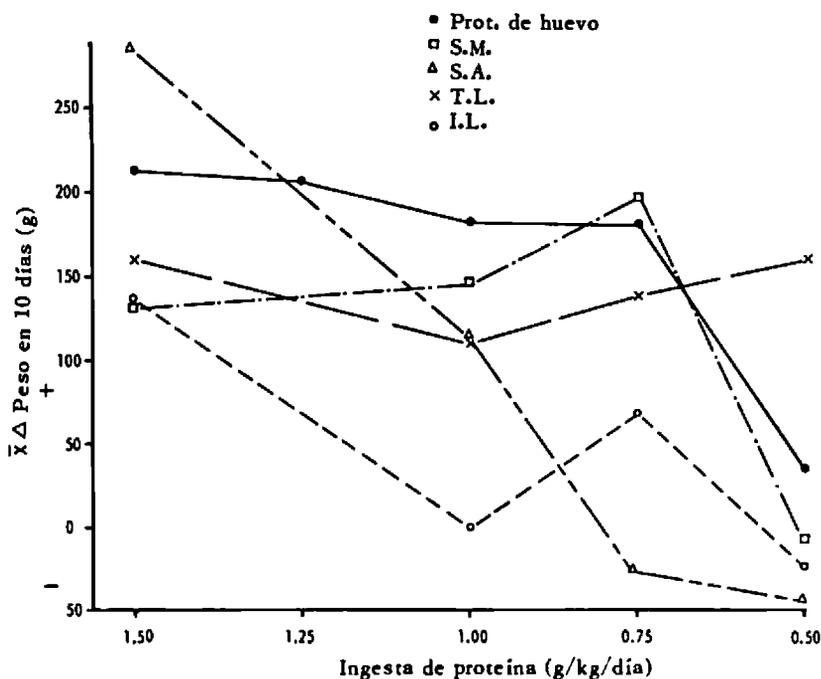
Las Gráficas 8 y 9 muestran los cambios de peso y de las concentraciones proteínicas totales y de albúmina en el suero de niños, durante períodos de medición de balance nitrogenado para diversas proteínas. Estos datos indican que, bajo tales condiciones, ni los cambios en peso ni en concentración de proteínas totales o albúmina séricas, son discriminatorios para la calidad o cantidad de la proteína en estudio.

El Cuadro 5 presenta una comparación entre el puntaje químico de diversas fuentes proteínicas (por perfil de aminoácidos), la razón de eficiencia proteínica (en ratas) y los resultados relativos del índice de balance nitrogenado (en niños). Según se aprecia, los resultados del puntaje químico son muy distintos de los que se obtienen por métodos biológicos; además, indican calidades proteínicas que varían dentro de una misma magnitud. Sin embargo, sí existen diferencias evidentes entre los resultados en ratas y en humanos, las cuales asumen importancia al emplearse como base para nuevas formulaciones que persiguen mejorar la calidad de las diversas fuentes proteínicas.

Comparación del puntaje químico (perfil de aminoácidos) de diversas fuentes proteínicas y los valores obtenidos mediante pruebas biológicas en ratas y en niños

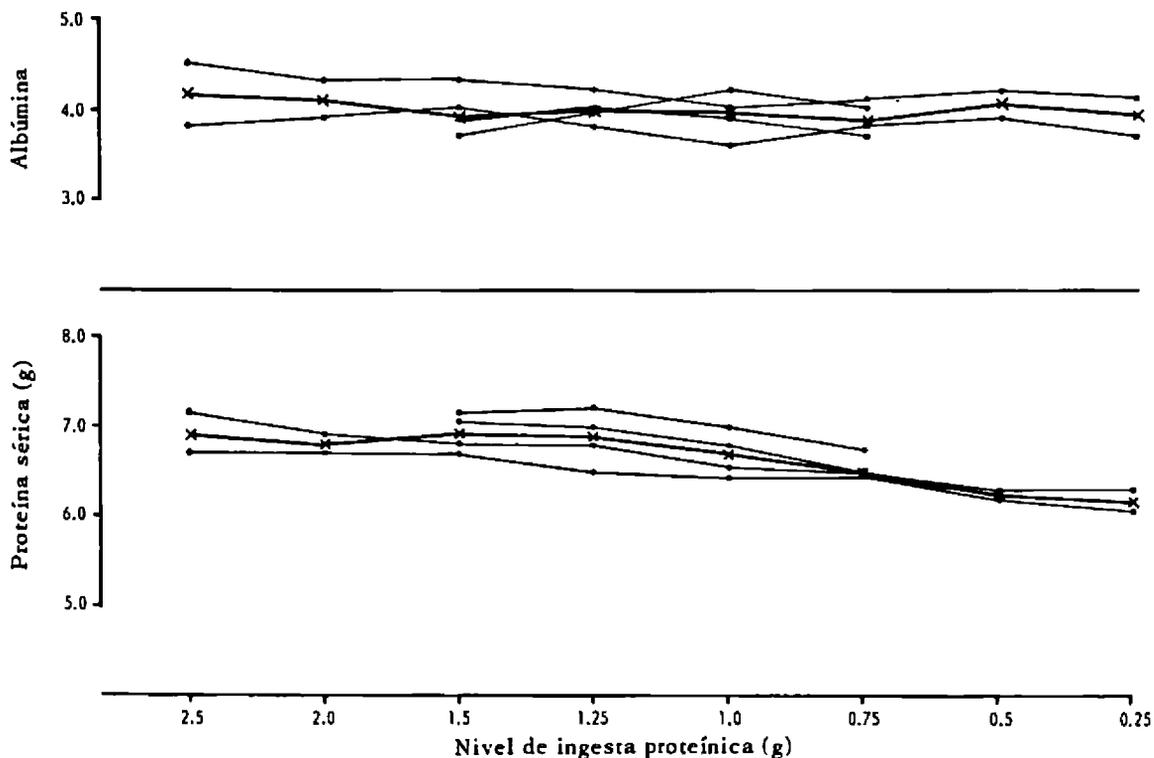
Fuente de proteína	% de deficiencia de aminoácidos limitantes Proteína de referencia		% de estándar de caseína en ratas PER*	Resultados relativos (% de la proteína de referencia)			
	Huevo	Leche humana		Índice de balance de N en niños		Ingesta de N necesaria para alcanzar equilibrio	Puntaje compuesto promedio
			N ingerido	N absorbido	Coefficientes de regresión N retenido versus N ingerido		
Huevo íntegro	-	65	101	95	98	96	98
Leche íntegra	71	-	89	104	95	106	102
S. M.	56	79	78	60	54	78	64
S. A.	56	76	93	65	67	101	78
T. L.	60	85	83	76	76	111	88
I. L.	59	80	85	78	76	98	84
Mezcla Vegetal INCAP 9	57	80	67	57	64	89	70
Mezcla Vegetal INCAP 14	52	72	78	96	82	96	91
Mezcla Vegetal INCAP 15	54	76	76	70	62	78	70

* PER = Razón de Eficiencia Proteínica: g de aumento de peso/g de proteína ingerida.



GRAFICA 8

Cambios en peso obtenidos con ingestas y fuentes proteínicas diferentes.



GRAFICA 9

Cambios en la concentración de proteínas séricas totales y albúmina, con cambios en el nivel de ingesta proteínica (de huevo).

Comentario Final

Se espera que, en base a los conceptos expresados en este trabajo, y en la descripción detallada de los diversos procedimientos para evaluar la calidad de proteínas de diversas fuentes en humanos, que han sido delineados y discutidos, se establezcan métodos estandarizados en los diversos centros que se interesan en ese campo. Si la presente exposición logra, además, estimular un intercambio de ideas entre los investigadores de esta importante rama de la nutrición humana, nuestros esfuerzos habrán sido más que recompensados.

Referencias

1. Scrimshaw, N. S., and M. Béhar. World-wide occurrence of protein malnutrition. *Fed. Proc.*, 18:82, 1959.
2. Scrimshaw, N. S. The urgency of world food problems. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* 95:789, 1966.
3. Bressani, R. Evaluación biológica de las proteínas. Véase este volumen, p. 21.
4. Arroyave, G. Consideraciones sobre requerimientos de proteínas y de aminoácidos. Véase este volumen, p. 3.
5. Viteri, F. E., and J. Alvarado. The creatinine height index: its use in the estimation of the degree of protein depletion and repletion in protein calorie malnourished children. *Pediatrics*, 46: 696, 1970.
6. Picou, D., and J. C. Waterlow. The effect of malnutrition on the metabolism of plasma albumin. *Clin. Sci.*, 22:459, 1962.
7. Viteri, F. E., J. M. Flores, and M. Béhar. Intestinal absorption in protein calorie malnutrition. En: *VIIIth International Congress of Nutrition. Abstracts of Papers.* Hamburg, 3-10 VIII, 1966, p. 46.
8. Chan, H., and J. C. Waterlow. The protein requirement of infants at the age of about one year. *Brit. J. Nutr.*, 20:775, 1966.
9. Hansen, J. D. L. The assessment of the nutritive value of a dietary protein for children. *Abstracts, Fifth International Congress on Nutrition, September 1-7, 1960.* Washington, D. C. (c.f. *Nutr. Abst. Revs.*, 31: 369, 1961). Abs. No. 125.
10. *Protein Requirements.* Report of a Joint FAO/WHO Expert Group. Published jointly by FAO and WHO. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1965. (FAO Nutrition Meeting Report Series No. 37, issued also as WHO Technical Report Series No. 301).
11. *Calorie Requirements.* Report of the Second Committee on Calorie Requirements. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1957. (FAO Nutritional Studies No. 15).
12. Stuart, H. C., and S. S. Stevenson. Care and Evaluation of Well Children. Physical growth and development. En: *Textbook of Pediatrics.* W. A. Nelson (ed.). 6th ed. Philadelphia, W. B. Saunders Co., 1954, p. 10.
13. National Research Council. *Recommended Dietary Allowances.* 7th rev. ed. Washington, D.C., National Academy of Sciences - National Research Council, 1968. (Publication No. 1694).

14. Fomon, S. J. Body composition of the infant. Part I: The Male "Reference Infant". En: *Human Development*. F. Falkner (ed.). (Chapter 10). Philadelphia, W. B. Saunders Co., 1966, p. 239.
15. Rose, H. E., and J. Mayer. Activity, calorie intake, fat storage, and the energy balance of infants. *Pediatrics*, 41: 18, 1968.
16. Viteri, F. E., G. Arroyave, and M. Béhar. Estimation of protein depletion in malnourished children by a creatinine height index. En: *VIIIth International Congress of Nutrition. Abstracts of Papers*. Hamburg, 3-10 VIII, 1966, p. 46.
17. Hamilton, L. F., and S. G. Simpson. *Talbot's Quantitative Chemical Analysis*. 9th ed. New York, The McMillan Co., 1946, p. 355.
18. Clark, L. C., and H. L. Thompson. Determination of creatine and creatinine in urine. *Anal. Chem.*, 21:1218, 1949.
19. Bressani, R., N.S. Scrimshaw, M. Béhar, y F. Viteri. Suplementación con aminoácidos de las proteínas de los cereales. II. Efecto de la suplementación con aminoácidos de la masa de maíz, a niveles intermedios de ingesta proteica, sobre la retención de nitrógeno de niños pequeños. *Publicaciones Científicas del INCAP, Recopilación No. 4*. Washington, D.C., Organización Panamericana de la Salud, p. 259, 1962. (Publicaciones Científicas No. 59).
20. Huang, P. C., V. R. Young, B. Cholakos, and N. S. Scrimshaw. Determination of the minimum dietary essential amino acid-to-total nitrogen ratio for beef protein fed to young men. *J. Nutrition*, 90:416, 1966.
21. Allison, J. B. The nutritive value of dietary protein. En: *Mammalian Protein Metabolism*. H. B. Munro and J. B. Allison (eds.). New York, Academic Press, 1964, Vol. II, p. 41.
22. Allison, J. B., J. A. Anderson, and R. D. Seeley. Some effects of methionine on the utilization of nitrogen in the adult dog. *J. Nutrition*, 33:361, 1947.
23. Brush, M., W. Willman, and P.P. Swanson. Amino acids in nitrogen metabolism with particular reference to the role of methionine. *J. Nutrition*, 33:389, 1947.
24. Said, A. K., and D. M. Hegsted. Evaluation of dietary protein quality in adult rats. *J. Nutrition*, 99:474, 1969.
25. Fomon, S. J., E. M. DeMaeyer, and G. M. Owen. Urinary and fecal excretion of endogenous nitrogen by infants and children. *J. Nutrition*, 85:235, 1965.
26. Sirbu, E. R., S. Margen, and D. H. Calloway. Effect of reduced protein intake on nitrogen loss from the human integument. *Am. J. Clin. Nutr.*, 20:1158, 1967.
27. Mitchell, H.H., T. S. Hamilton, and W. T. Haines. The dermal excretion under controlled environmental conditions of nitrogen and minerals in human subjects, with particular reference to calcium and iron. *J. Biol. Chem.*, 178:345, 1949.