

REQUERIMIENTOS DE PROTEINA Y DE AMINOACIDOS EN EL PRIMER SEMESTRE DE LA VIDA

Dres. Alejandro M. O'Donnell, M. Claudia Gómez

El conocimiento de los requerimientos nutricionales de los niños es fundamental en situaciones de salud y enfermedad así como para acciones de salud pública y evaluación de programas. Su determinación no es sencilla, ni aun en el primer semestre de la vida en que los niños reciben habitualmente un solo alimento, idealmente la leche de su madre. En esta revisión intentaremos actualizar el conocimiento referente a los requerimientos de proteína y aminoácidos en los primeros seis meses de la vida, el período de mayor velocidad de crecimiento del ser humano, además pleno de peculiaridades por la inmadurez funcional de los niños de esta edad (Reeds and Hutchens, 1994).

Determinación de los requerimientos de proteína y aminoácidos en el primer semestre de la vida

Distintas aproximaciones se han empleado para la determinación de los requerimientos de proteína y aminoácidos en los lactantes menores de seis meses.

a) Asumiéndose que la composición de la leche de madre es ideal para mantener un óptimo estado nutricional de niños hasta los 4-6 meses, se ha tomado al contenido proteico de la leche de madre como patrón de referencia, considerándose que los requerimientos pueden ser satisfechos solamente con la ingesta de leche materna. Conociendo el volumen de leche consumida, y su composición, es posible una aproximación a los requerimientos de proteína y de los aminoácidos.

b) El método factorial en el cual se miden las

ingestas y las pérdidas de nitrógeno por orina y heces, permite estimar la porción del requerimiento que se destina a mantenimiento de la masa corporal actual, más las necesidades de crecimiento, a las que se suman las pérdidas obligatorias inevitables por descamación de la piel, crecimiento de faneras, y sudoración.

c) Otro es el método experimental por el cual grupos de niños reciben ingestas decrecientes de proteína y/o de un aminoácido en estudio hasta que se afectan funciones biológicas predeterminadas. Este fue el enfoque de los clásicos estudios de Snyderman y col (1961), hoy irrealizables por razones éticas.

d) Un enfoque parecido es alimentar grupos de niños con una fórmula conocida, pero con concentraciones decrecientes de proteína hasta que se altera la velocidad de crecimiento, o se produce disminución de la albúmina sérica o disminuye la urea sanguínea. Llegado ese momento puede no sólo inferirse que la ingesta de proteína es inadecuada, sino que como se conoce con exactitud la ingesta diaria de alimento y por ende de aminoácidos, es posible inferir que se alcanzó el nivel mínimo de ingesta pero sin establecerse cuál es el aminoácido limitante (Fomon et al, 1972).

e) Otro es el método denominado operativo (Waterlow 1990), basado en la relación energía-proteína, por el cual se considera que si con la leche materna se cubren los requerimientos de energía necesariamente se cubrirán las necesidades de proteína. Si bien es práctico, el P%, o sea el porcentaje de las calorías de la alimentación provenientes de las proteínas varía de 8,8% en el primer mes de vida a 4,5% al cabo de los 12 meses de edad.

f) Calculando los cambios en la composición corporal que tienen lugar en los niños en determinados intervalos de edad, es decir la composición de la masa corporal depositada (Fomon y col, 1982). Este mismo enfoque, enriquecido con el cálculo del costo energético de la síntesis del tejido magro y adiposo, y la acumulación de los principales minerales mayores, con las adaptaciones necesarias para adecuarse a la fisiología de los niños de pretérmino (malabsorción intestinal, limitaciones en la función renal, etc) fué empleado por Ziegler y col (1976) para calcular los requerimientos nutricionales de los RN de pretérmino.

g) El seguimiento de las vías metabólicas de aminoácidos marcados con isótopos estables; que es hoy el método más empleado para estudiar el recambio del nitrógeno corporal. Habitualmente se emplean aminoácidos no esenciales -glicina- para estudiar el recambio corporal total de nitrógeno, o aminoácidos esenciales para estudiar los pasos metabólicos respectivos. El destino de los aminoácidos, administrados por vía parenteral como bolo o en infusión continua, o por vía oral, es rastreado por la incorporación de la marca en otros aminoácidos, en metabolitos, como la urea o el amonio, o por la eliminación por la respiración de CO₂ marcado (Bier, 1989).

Si bien estos métodos han dado resultados más o menos coincidentes en lo que hace a requerimientos de proteína, existe preocupación por los requerimientos de aminoácidos, sobre lo cual la información es aun deficiente.

El principal parámetro contra el cual han sido comparados todos los métodos anteriores ha sido lograr un crecimiento adecuado en los primeros seis meses de la vida. Sin embargo no existe consenso sobre qué es crecimiento adecuado. Es conocido que los niños amamantados aumentan menos a partir del 2° o 3° mes de vida, aunque con menores diferencias en longitud corporal, que los alimentados con fórmulas (AAP, 1997; Dewey et al, 1993; Heinig et al, 1993). Sin embargo no se sabe a ciencia cierta si antes de disminuir la velocidad de crecimiento corporal no se deterioran funciones biológicas importantes como la función inmunológica o el desarrollo intelectual, tal como sucede en niños que inician un proceso de desnutrición. Por ello algunos investigadores consideran que el crecimiento como parámetro de adecuación nutricional pudiera subestimar los requerimientos considerando las necesidades para un óptimo funcionamiento biológico (Lucas y col, 1990).

Por otro lado, y basado en estudios experimentales en animales, se ha cuestionado si el máximo crecimiento es el ideal (Dewey y col, 1996); existe además preocupación sobre si elevadas ingestas de proteína en los niños pequeños pueden perjudicar algunas funciones biológicas en el largo plazo (función renal, desarrollo intelectual, obesidad) (Butte,

2001; Rosenvinge et al, 1999) aunque no haya evidencias experimentales o epidemiológicas categóricas (Young and Pelletier, 1989).

Requerimientos de proteína en los lactantes

Como se dijo, el fundamento para tomar a la proteína de la leche de madre como alimento de referencia se basa en que si la cantidad de energía provista por la leche es adecuada, también se satisfará el de proteína, que por ser propia de la especie, será de una composición y calidad nutricional ideal. Este argumento evolucionista, por ser la base de las estimaciones de los requerimientos de energía y de proteína en niños pequeños, debe ser meditado.

Fomon (1993) ha cuestionado este argumento al considerar que el bajo contenido en proteína de la leche humana es un compromiso entre las necesidades del niño y la preservación del estado nutricional de la madre; la disminución de la velocidad de crecimiento de los niños después del 2°-3er mes sería una confirmación de esta hipótesis. Los detractores de esta hipótesis responden calculando que una producción de leche de 800ml/día, significa no más de 8 g/día de expropiación proteica para las madres, lo que no representa más del 12% de las RDA de proteína para una mujer nodriza. Y aducen que la deficiencia de proteína no es habitual aun en las sociedades más primitivas y pobres.

Pero al mismo tiempo, estudios en el INCAP (1999) observan que suplementando con mínimas cantidades de energía y proteína a mujeres embarazadas en comunidades muy pobres, se lograban efectos mensurables y persistentes en el largo plazo sobre el peso de nacimiento, crecimiento, desarrollo intelectual, escolaridad y desarrollo sexual en los hijos de las madres y nodrizas que recibieron el suplemento.

Cuando se consideran otras variables como desarrollo intelectual (Lucas y col, 1992 y 1998) e inmunidad, ganan los niños alimentados exclusivamente al pecho. Los conocidos factores inmunológicos de la leche humana, la menor frecuencia de infecciones en los niños amantados y la mejor relación del niño con sus progenitores, justifican las diferencias notadas, que no son de índole exclusivamente nutricional; salvo el deterioro que pudiese producir la reiteración de infecciones.

Tomando como referencia a la leche humana para la estimación de los requerimientos de proteína en lactantes, la FAO-OMS (1985) consideró que el contenido de proteína de la leche humana se mantenía estable en 1,15g/dl (nitrógeno total x 6.25) a partir del primer mes de lactancia, y aunque se reconoció que una importante cantidad de nitrógeno de la leche humana era nitrógeno no proteico (NNP) se asumió que este NNP era íntegramente utilizado.

La información disponible en ese entonces sobre cantidad de leche consumida en lactancias normales era subestimada -por cuestiones metodológicas- en 3-6%. También se empleó como referencia de tamaño corporal y de velocidad de crecimiento de lactantes en el primer semestre las curvas del NCHS, hoy cuestionadas por las diferencias en velocidad de crecimiento reconocidas entre niños alimentados al pecho o artificialmente. También se asumió como requerimiento el consumo promedio de leche de los niños normales, con lo que la mitad de los niños tendría insatisfechos sus requerimientos de proteína.

Hoy se reconoce que la concentración de proteína en la leche humana disminuye a lo largo de la lactancia. (Lønnerdal, 1993). El calostro (1-5 días postparto) contiene entre 2 y 3 g/dl; al 10º día ya ha disminuido a 1,3-1,5 g/dl; a los 30 días de lactancia 1,0-1,2g/dl y más adelante, 0,8-0,9g/dl. Estas cifras son de "contenido proteico verdadero" (N total -NNP).

Las proteínas en la leche humana se suelen dividir en dos clases principales: caseína y proteínas del suero. En general, las caseínas son fácilmente digeridas y utilizadas, mientras que la digestibilidad de algunas de las proteínas del suero es más limitada (Lindberg et al, 1982), pudiéndose encontrarlas intactas en las heces de niños amamantados (Kuntz and Lønnerdal, 1992; Davidson and Lønnerdal, 1990).

El contenido en caseína del calostro es mínimo, pero aumenta rápidamente durante la fase de transición, disminuyendo ligeramente en las lactancias muy prolongadas; lo inverso ocurre con las proteínas del suero, muy altas en el calostro, para disminuir inmediatamente en los primeros días de lactancia. Así la razón suero:caseína, aunque no constante en todas las nodrizas, va de 90:10 en los inicios de la lactancia, a 55:45 en la lactancia media y 50:50 en la lactancia muy tardía (Kuntz and Lønnerdal, 1992). Estas razones son importantes por las diferencias en digestibilidad y por lo tanto en la estimación de los requerimientos de proteína y aminoácidos.

La proporción de NNP en la leche humana -20-25% del nitrógeno total en leche madura - (Räihä, 1989) es elevado respecto a la leche de otras especies. Dentro del NNP se incluyen aminoácidos libres, taurina principalmente, y pequeños péptidos (30% del NNP) que contribuyen al requerimiento de aminoácidos esenciales y no esenciales.

De los componentes del NNP, el principal es la urea (50% del NNP). Fomon y col (1988) han estimado que en promedio, 13% del nitrógeno ureico ingerido participaría en la síntesis endógena de proteínas y ácidos nucleicos en el lactante normal a través de su absorción intestinal o luego de su transformación en amonio por acción de las bacte-

rias entéricas y colónicas. Es posible que la proporción de nitrógeno ureico utilizado por el lactante dependa de su aidez de nitrógeno, tal como lo demuestran los estudios realizados en lactantes en recuperación de un proceso infeccioso (Heine et al, 1986) o en los de bajo peso de nacimiento (Donovan, 1990), ambos con requerimientos aumentados.

Otros componentes nitrogenados no proteicos como colina, carnitina, creatinina, péptidos biológicamente activos, nucleótidos, carbohidratos nitrogenados (ácido siálico) participan en la síntesis de lípidos y ácidos nucleicos y probablemente participen en la síntesis de aminoácidos; su concentración es muy baja por lo que su rol nutricional estricto no es importante (Donovan and Lønnerdal, 1989).

Estudios de Butte y col (1984), y de Heinig y col (1993) -más modernos y metodológicamente muy correctos- estiman que alrededor del 26% del nitrógeno en la leche humana es NNP. De éste, el aminonitrógeno y glucosamina (componen el 35% del total del NNP) son totalmente utilizados y 17-40 % del NNP restante también es utilizable. De esta manera, 41 a 60% del NNP es nutricionalmente utilizable.

La suma de este NNP nutricionalmente útil más el nitrógeno proteico es la *ingesta proteica ajustada* [(N proteínico x 6,25 + (nitrógeno _amínico + glucosamina + algunos di o tripéptidos y parte de la urea)].

Así, la *ingesta ajustada de proteína* (expresada en g/kg/día) declina drásticamente desde el primer mes (1,95-2,04g/Kg/día) a 1,05-1,16 al mes y a 1,05-1,16 al 4º- 6º mes. Estos valores difieren en menos 10 y 26% de la estimación FAO-OMS de 1985 y la diferencia se debe a la estimación del aprovechamiento nutricional del NNP, al peso considerado de los lactantes y a la disminución en la concentración de proteína a lo largo de la lactancia. Estos datos no fueron tenidos en cuenta o no existían al producirse el dictamen mencionado, que oficialmente continúa vigente.

El método factorial para el cálculo de los requerimientos proteínicos del lactante

El método factorial es el cálculo de los requerimientos de mantenimiento más los destinados al crecimiento. Para ello es necesario recurrir al método de balance metabólico -tan propenso a errores técnicos que habitualmente llevan a una sobreestimación de los resultados (Fomon, 1993)-, a medir la velocidad de crecimiento y la composición del tejido neoformado, las variaciones diarias en la velocidad de crecimiento, la eficiencia de la conversión de la proteína dietaria en proteína tisular, y la variabilidad individual en todos los elementos antes mencionados.

Los requerimientos de mantenimiento son estimados por estudios de balance como la cantidad de

proteína necesaria para mantener el balance cero - de equilibrio, sin crecimiento- y por la regresión de retención de nitrógeno sobre ingesta nitrogenada agregando 10mg N /Kg/día por pérdidas cutáneas de N. El estudio de Huang y col (1981) estimó el valor de mantenimiento en 113 mg N / Kg/día, aunque en este estudio los niños tuvieron ingestas energéticas por debajo de lo normal, razón por la cual es probable que se haya incurrido en una sobreestimación de las necesidades de proteína para mantenimiento. Basados en datos de diferentes estudios de Fomon y col (Fomon, 1993) reanalizados con la misma metodología estadística sería más adecuado estimar las necesidades de mantenimiento en 90 mg N /kg/día.

Otra de las alternativas, para la evaluación de los requerimientos de proteína en niños alimentados con fórmulas han sido la evaluación del patrón de aminoácidos plasmáticos postprandiales. Este, en teoría, refleja la ingesta y síntesis proteica, el recambio de aminoácidos (catabolismo, síntesis y excreción), y la utilización tisular. En una palabra, sería un grosero indicador del balance entre ingesta y utilización, y por ello ha sido empleado como indicador de ingestas insuficientes o excesivas. También se ha empleado como referencia el patrón aminoacídico plasmático de niños alimentados con leche humana. La uremia es otro indicador de utilización pero debe tenerse en cuenta que tanto la leche humana como algunas fórmulas contienen cantidades importantes de este compuesto nitrogenado que contribuye a la elevación de los niveles plasmáticos de urea.

Los requerimientos de aminoácidos deben considerarse según dos vertientes. Los necesarios para el mantenimiento y los destinados a crecimiento. Para el crecimiento las necesidades de un aminoácido en particular deben considerarse teniendo en cuenta su aporte a la síntesis de la proteína a ser depositada como crecimiento, y a la tasa de crecimiento de un niño en un momento específico de su vida.

En teoría, el alimento para niños en muy rápido crecimiento debería contener todos los aminoácidos esenciales y no esenciales en cantidades similares -o aproximadas- a la composición aminoacídica del tejido neoformado, de crecimiento. Según este criterio los esfuerzos para confeccionar sustitutos de la leche materna o para obtener el mejor catch-up en niños enfermos, deberían dirigirse a imitar a la composición del tejido de crecimiento más que a la leche materna.

La leche de los animales con mayor velocidad de crecimiento postnatal difiere de otros que crecen más lentamente en que es más rica en proteína aunque su contenido en aminoácidos esenciales y la composición del tejido magro -o sea crecimiento- sea notablemente similar entre especies.

Al comparar la relación AA esenciales/AA tota-

les en la leche vs la composición del tejido magro, con la excepción de los aminoácidos azufrados en los animales con piel, existe una sorprendente similitud entre especies, independientemente de la velocidad de crecimiento de los neonatos y del grado de madurez con que nacen. Tres aminoácidos - leucina, glutamato/glutamina y prolina - representan casi 40% de los aminoácidos de las leches y comparando el patrón de aminoácidos de la leche con el del tejido magro, en todos las especies las leches son "deficitarias" en glicina y arginina (Dewey y col, 1996).

La razón fisiológica para estas diferencias entre la composición aminoacídica de las leches y el tejido magro no es conocida, y no pueden ser explicadas por las necesidades de mantenimiento ya que estas requieren de una cantidad grande de aminoácidos no esenciales. Comparado con otros mamíferos el lactante tiene una muy lenta velocidad de crecimiento con lo que la mayor proporción del requerimiento de aminoácidos se destina al mantenimiento de la masa corporal ya formada (más del 50%, aun en el primer mes de la vida) (Davis et al, 1984). En relación a este fenómeno se ha propuesto que las necesidades de aminoácidos en la proximidad del requerimiento está dominada por tres factores: a) pérdida constante de aminoácidos hacia la luz del intestino, especialmente importante en el caso de la treonina, b) la síntesis de algunos metabolitos importantes de los aminoácidos glicina/ creatinina y cisteína/taurina y c) mantenimiento de rutas metabólicas que utilizan aminoácidos participantes en las defensas del organismo: síntesis de glutatión, óxido nítrico, nucleótidos que requieren glutamina, glutamato, cisteína, glicina, arginina y ácido aspartico, llamando la atención que estos aminoácidos son no esenciales o condicionalmente esenciales.

Sobre la base de la información existente puede afirmarse que en ningún momento de los primeros 6 meses de la vida, la leche de madre provee aminoácidos esenciales por debajo de los requerimientos. Al mismo tiempo, la provisión de aminoácidos no esenciales -especialmente glicina- es inferior a lo estimado. Ello lleva a considerar que parte de los aminoácidos esenciales son empleados para la síntesis de aminoácidos no esenciales, siendo suficientes como para satisfacer las necesidades en el primer semestre de la vida. Es probable que el contenido de cisteína para la síntesis de taurina o de glicina para la síntesis de creatina y nucleótidos en la leche humana contribuya a la disminución de las necesidades alimentarias de estos compuestos.

La calidad de la proteína en los primeros seis meses de la vida, en prematuros y niños de término.

Como antes se mencionara, es el período en que

la velocidad de crecimiento es la mayor de toda la vida de un ser humano; más todavía en los prematuros en crecimiento. Es también el único momento de la vida en que el ser humano -salvo en pacientes críticos en alimentación enteral o parenteral- recibe todos los nutrientes de una sola fuente, sea leche materna o fórmulas infantiles. También es un momento en que la inmadurez de varios sistemas, así como de la barrera hematoencefálica obliga a una alimentación que no produzca ni deficiencias ni excesos. También obliga, en el caso de las fórmulas, a una adecuada elección de todos sus componentes, los de mejor absorción, los que produzcan la menor sobrecarga de solutos, que contengan todos los minerales y vitaminas, en cantidades adecuadas y sin que se interfiera la biodisponibilidad de unos a causa de otros.

También se han planteado situaciones de alarma relacionadas con una ingesta excesiva de proteína -y de aminoácidos- ante la posibilidad de incurrirse en daño cerebral, sobre todo en prematuros o lactantes muy pequeños. Se ha especulado que la elevación de los aminoácidos ramificados en el plasma, típico de la alimentación con excesivas cantidades de proteína de leche de vaca interfiere con el transporte a través de la barrera hematoencefálica de aminoácidos esenciales precursores de la síntesis de neurotransmisores como la serotonina en el caso del triptofano.

Así Goldman y col (1974) quien siguió a niños de término que recibieron cantidades elevadas de proteína en el periodo postnatal (3 a 9 g/ Kg/día) encontró que un número significativo de ellos presentó algún grado de deterioro en el desarrollo madurativo. Menkes y col (1972) describieron elevaciones sustantivas de la tirosina plasmática en neonatos que recibieron alta ingesta de proteínas, acompañado de deterioro en las funciones cerebrales superiores en un número significativo de niños. Hallazgos similares fueron reportados por Mamunes y col (1976). Sin embargo en la tirosinosis los niños tienen elevados niveles de tirosina plasmática, sin deterioro intelectual.

En los niños prematuros y menos frecuentemente en los niños a término, se puede observar un defecto transitorio en el metabolismo de la tirosina como consecuencia del retraso en la maduración de la enzima p-hidroxifenil-pirúvico-oxidasa, a una excesiva ingesta proteica (principalmente con predominio de suero de leche), o de una deficiencia relativa de vitamina C o una combinación de ellas.

Si bien estos estudios fueron realizados hace mucho tiempo, cuando el cuidado neonatal era relativamente primitivo y se desconocía, por ejemplo, el efecto de la deficiencia de los PUFA de cadena larga, de la taurina en los prematuros, de la deficiencia de micronutrientes sobre el feto y el RN, y que las fórmulas empleadas eran groseramente di-

ferentes de la leche humana en su composición centesimal, tanto que la concentración de algunos aminoácidos era 20 veces mayor que en los alimentos con leche de madre, lo cierto es que son señales de alarma que no pueden ser desoídas.

En niños alimentados con fórmulas con predominio de suero se han hallado elevadas concentraciones de treonina pero no se han descrito consecuencias negativas por ello. Sistemáticamente se ha encontrado que los niveles de tirosina y fenilalanina son más altos en los niños alimentados con fórmulas respecto a los amamantados; especialmente los que reciben fórmulas con predominio de caseína.

La calidad de la proteína en las fórmulas

De lo expuesto se destacan hechos que tienen importancia para la alimentación artificial del lactante, reafirmando la calidad insuperable de la proteína de la leche humana.

Cuando los métodos analíticos lo permitieron se determinó que la composición en aminoácidos de la proteína de la leche de vaca era sustancialmente diferente de la leche humana, y que la cantidad de proteína en la leche de vaca, -300% más elevada que en la leche humana- producía groseras diferencias en los aminogramas plasmáticos. De allí la recomendación de dilución de la leche a los 2/3, resultando en una concentración de 2,0 a 2,3 g/dl que todavía representa una ingesta exagerada para los lactantes más pequeños.

Surge entonces la idea de suplementar la proteína de la leche de vaca con suero de leche, que aportaba algunos aminoácidos escasos en esta proteína -cistina y triptofano-, a pesar de un exceso de triptofano en el suero de la leche de vaca que no se consideró dañino. Con ello se disminuía además el exceso de aminoácidos aromáticos. El patrón de aminoácidos más parecido al de la leche de madre se lograba con una relación suero 60: caseína 40. Ello permitió la disminución de la concentración de proteína en las fórmulas hasta 1,8 y 1,5 g/dl; así todo estas fórmulas contienen hasta 200% más de algunos aminoácidos. El contenido de nitrógeno no proteico es notablemente mayor en la leche humana que en las fórmulas, y algunas de las fracciones proteicas en la leche de vaca son inexistentes en la leche humana (b-lactoglobulina).

La leche de vaca difiere de la leche humana por su contenido en proteína de caseína o del suero. La caseína es la proteína del cuajo, que se obtiene por precipitación al llevar la leche a un pH de 4.6; el sobrenadante es el suero, habitualmente empleado en la industria quesera. La proporción de caseína en la proteína de la leche de vaca es 80% y del suero, 20%; en la leche humana clásicamente se ha establecido en 60% proteína del suero y 40%

caseína, lo cual no es rigurosamente cierto como antes se ha mencionado (Kunz and Lönnerdal, 1990).

En la leche humana prácticamente toda la caseína es b-caseína; en la leche de vaca si bien la b-caseína es un componente importante, la mayor parte de la caseína es as1-caseína (predominante) y as2- caseína. La composición en aminoácidos de las diferentes clases de caseínas difiere sustancialmente.

Los principales componentes del suero de la leche humana son a-lactalbúmina, inmunoglobulinas, lactoferrina; el principal componente de la proteína del suero de la leche de vaca es b-lactoglobulina. El contenido en aminoácidos azufrados -metionina, cisteína, cisteína- es mayor en las proteínas del suero que en la caseína; la taurina está prácticamente ausente en ambas fuentes. Ambas leches contienen albúmina sérica que es antigénica y químicamente muy diferente; pero es idéntica a la albúmina sérica de las respectivas especies (Picciano, 2001).

La composición de la proteína de la leche humana cambia sustancialmente con el transcurso de la lactancia, alterándose la relación suero:caseína, variando de 90:10 en los primeros días de lactancia hasta 50:50 en las lactancias prolongadas. Todavía más varía la composición de las diferentes subunidades de caseína (Kunz and Lönnerdal, 1990).

La digestibilidad de las proteínas de las fórmulas infantiles - que puede ser evaluada in vitro por digestión enzimática, por la incubación con jugo entérico de niños, o mediante balance metabólicos de obvia importancia en la provisión de los requerimientos. Puede afectarse durante la manufactura por errores tecnológicos pero fundamentalmente por el tiempo y la intensidad del tratamiento térmico empleado, así como cual sea la proteína prevalente en la fórmula, suero o caseína. La menor digestibilidad se observó en las fórmulas esterilizadas (> 110°C por tiempo prolongado) con el producto enlatado, mejor en las en polvo (spray, >60°C por breve tiempo) y la mayor digestibilidad en las esterilizadas por el método UHT (calentamiento a >130°C durante 3 a 5 segundos), con diferencias entre 72 y 84%. El calentamiento produce además reacciones de Maillard -caramelización- que es la unión de aminoácidos con hidratos de carbono produciendo compuestos sin valor nutricional y hasta nocivos (Räihä, 1985).

La importancia nutricional de las diferencias en digestibilidad no es de despreciar. Luego de la administración de un alimento ocurre un aumento en los aminoácidos plasmáticos, que disminuye al tiempo con la utilización y redistribución de los mismos por el organismo. En recién nacidos de término, la leche humana produjo una rápida elevación post-

prandial de los aminoácidos, con vuelta a los valores basales antes de las dos horas; las fórmulas UHT tuvieron el mismo patrón, intermedio las fórmulas en polvo y en las esterilizadas aún a las 4 horas de ser administradas no se había regresado al valor basal. Corolario es que la evaluación de patrones basales de aminoácidos en niños alimentados con formulas esterilizadas pueden no ser verdaderamente basales sino remanentes de un biberón anterior. Una complicación más en el ya confuso panorama de la evaluación de los requerimientos de aminoácidos en niños pequeños.

Estudios clínicos con fórmulas con distintas concentraciones y tipo de proteína en recién nacidos de pretermino y lactantes pequeños

La mayor parte de los estudios que han empleado aminogramas plasmáticos para la evaluación de la calidad y adecuación de la ingesta proteica se han hecho en niños menores de tres meses y en prematuros.

Priolisi y col (1992) estudiaron prematuros (peso de nac: ≥ 1650 g, adecuado para edad gestacional) con tres fórmulas de diferente relación suero: caseína 60:40, 50:50 y 35:65, comparándolos con un grupo alimentado con leche humana. El contenido proteínico de todas las fórmulas era 2,2gr/dl; la leche humana de banco fué fortificada con 1gramo/dl con proteína de leche de madre obtenida por ultrafiltración. De esta manera los cuatro esquemas alimentarios tenían la misma concentración proteica y energética; la ingesta fué de 3.3-3.5g de prot./Kg de peso y 121-122 Kcal/Kg en todos los grupos. No hubo diferencias en ningún parámetro bioquímico ni en velocidad de crecimiento entre los grupos. En los aminogramas se encontró que todas las fórmulas producían una elevación de la treonina (máxima con la fórmula 60:40, y menor en la 35:65), de valina, fenilalanina, y metionina respecto a los aminogramas de los alimentados con proteína de leche humana. Sólo los aminoácidos esenciales alcanzan diferencias estadísticamente significativas.

Este estudio muestra que la fuente proteica no afecta el crecimiento ni los índices bioquímicos de tolerancia metabólica (urea, estado ácido-base, etc.) si la ingesta proteica y energética es adecuada en prematuros de bajo peso de nacimiento. La mayor similitud en los aminogramas respecto a la leche materna se halló en la fórmula con la relación suero: caseína 50:50.

Rahia et al (1976) encontraron en prematuros alimentados con fórmulas con predominio de caseína una mayor incidencia de acidosis metabólica leve (-4 EB) durante las primeras 7 semanas postnatales respecto a niños alimentados con fórmulas basadas en suero.

Bernebaum y col (1989) realizaron un estudio con diseño parecido (peso de nac: ≥ 1750 g) aun-

que con niños ligeramente más maduros. Estudió dos fórmulas con 1,5 gr/dl de proteína con 60:40 y 20:80 de relación suero:caseína) no encontrando diferencia alguna en cuanto a parámetros antropométricos ni indicadores nutricionales. No se observó acidosis metabólica.

Kashyap y col (1986, 1987, 1990) ensayaron formulas 60:40 y 18:82 con igual concentración proteínica y energética, en prematuros de 900-1750g. No encontraron diferencias en crecimiento (ganancia de peso, longitud corporal y circunferencia craneana), como así tampoco en parámetros de nutrición proteínica ni estado ácido base. Se observó un aumento de la tirosina plasmática en los niños alimentados con la formula 18:82; en los alimentados con la fórmula 60:40, la treonina fué más elevada. La cisteína plasmática fué igual en ambos grupos pero la excreción urinaria de taurina, su metabolito, fué mayor en 60:40, seguramente como consecuencia del mayor contenido en cisteína de estas fórmulas.

Cooke y col (1992) estudiaron en prematuros (peso de nac: = ó ≥ 1250 g) tres fórmulas con diferentes relaciones suero:caseína (60:40; 35:65 y 18:82), que las recibieron durante una semana (3.3 g proteína Kg/día) al cabo de la cual se midieron aminoácidos plasmáticos y se realizaron 48 hs de balance metabólico. No hubo diferencias significativas en parámetros nutricionales o metabólicos, salvo en la absorción de fósforo que fué mayor a medida que era mayor la concentración de caseína. La concentración de treonina fué diferente de la del plasma de los niños que recibieron leche materna (60:40>35:65>18:82), y fenilalanina y tirosina también pero en un orden inverso al anterior. La absorción de nitrógeno difirió (60:40<35:65 y 18:82), lo mismo que la retención, en ese mismo orden. Sobre la base de estas observaciones los autores recomiendan como de elección la relación intermedia (suero 35:caseína 65) para los nacidos de muy bajo peso de nacimiento.

Lönnnerdal y Chen (1990) estudiaron lactantes de término desde el nacimiento hasta las 12 semanas alimentados a pecho o con una de las siguientes fórmulas: 1) 1,4 g/dl; 55:45, 2) 1,5 g/dl; 55:45, 3) 1,3 g/dl; 55:45, 4) 1,4 g/dl; 60:40, 5) 1,4 g/dl; 20:80. No hubieron diferencias antropométricas significativas entre los grupos. Los niveles de aminoácidos plasmáticos fueron mayores en el grupo que recibió la fórmula con mayor contenido proteico (1,5 g/dl), mientras que el grupo que recibió la fórmula con 1,3 g/dl 55:45 fue el que más se aproximó a los valores de los bebés amamantados así como también a sus índices metabólicos. El grupo que recibió la fórmula con predominio de caseína presentó menores niveles plasmáticos de triptofano.

Tikanoja y col (1982) midieron los aminoácidos plasmáticos en recién nacidos de término a los 30

minutos de admistrarles leche materna, una fórmula con predominio de suero (1,5 g proteína /dl), otra con la misma concentración proteica (1,5 g/dl) pero con predominio de caseína, y una tercera con predominio de suero con 3g/dl. Observaron que la concentración de aminoácidos plasmáticos (mayor en el grupo que recibió 3 g/dl) depende principalmente de la ingesta proteica, ya que el perfil plasmático de los grupos que recibieron las formulas con 1,5 g/dl de proteína fue similar independientemente del origen de la proteína.

Jarvenpaa y col (1982 a y 1982b) en niños de término tampoco hallaron diferencias en el estado ácido-base entre dos grupos alimentados con fórmulas con suero o caseína predominante.

Picone y col ((1989), con la hipótesis que una fórmula con una composición aminoacídica lo más parecida posible a la de la leche humana (suero: caseína 50:50), recomendada en anteriores investigaciones, estudiaron 4 grupos de niños: uno alimentado a pecho, patrón de comparación, y los 3 restantes con fórmulas con diferente concentración proteica: 1,1g/dl, 1,3 g/dl y 1,5 g/dl. El estudio se extendió por 12 semanas. Los cuatro grupo tuvieron crecimientos similares y normales, lo mismo que los parámetros de nutrición proteica, salvo la uremia que naturalmente era más elevada en el grupo 1,5gr/dl, como expresión de mayor ingesta proteica. El patrón aminoacídico de los niños que recibieron las tres fórmulas fue similar entre los grupos y difirió del de los niños amamantados sobre todo con las fórmulas de 1,5g/dl, pero aún con las de 1,1g/dl. Esto reafirma la imposibilidad de lograr aminoagramas iguales a los de los niños amamantados aún tratando de asimilar el patrón de aminoácidos de la fórmula al de la leche humana. Esto sugiere que otros factores tales como respuesta hormonal a la alimentación, diferencias en la biodisponibilidad de los aminoácidos de la leche humana y de vaca y cambios en la concentración y tipo de aminoácidos en la lactancia avanzada estarían involucrados.

Janas y col (1985, 1987) estudiaron tres grupos de niños de término desde la 2ª semana de vida hasta la 16ª. Un grupo fué alimentado a pecho, otro con una formula con 1,5 g/dl con predominio de suero (60:40) y otro con igual contenido de proteína pero con predominio de caseína (20:80). Este estudio es muy interesante pues muestra variaciones en varios parámetros bioquímicos entre los niños alimentados al pecho o con fórmulas, seguramente indicativas de la disminución en la concentración de proteína de la leche materna a lo largo de la lactancia así como de su contenido en caseína y suero. En general los alimentados a fórmula presentaron niveles de aminoácidos totales (29% en la fórmula 60:40 -p<0.001- y 17% en la 20:80- p:n.s) y esenciales más elevados que los alimentados por

sus madres; los niveles fueron más bajos en los que recibían la fórmula 20:80. Con ambas fórmulas se notaron elevaciones significativas de valina, metionina, fenilalanina, y con la fórmula 60:40, también de treonina, leucina, lisina e isoleucina. La urea sanguínea fué siempre más elevada en los de la relación 60:40, indicando un menor aprovechamiento de la proteína que la en fórmula a base de caseína (Taylor y col, 1974). Los autores concluyen que no existe ventaja metabólica alguna en el empleo de fórmulas 60:40 sobre 20:80.

Rahia y col (1986) ensayaron dos fórmulas 60% suero y 40% caseína con diferente concentración proteica, en niños de 2 a 12 semanas de edad, comparándolos con otro grupo amamantado con el objeto de determinar la cantidad ideal de proteína en las fórmulas. Los niños que recibieron fórmulas con 1,2 g/dl de proteína demostraron que esta concentración era insuficiente durante las cuatro primeras semanas de vida (inferior a la cantidad de proteína ingerida por los amamantados), estimado por la relación valina/glicina; así y todo el aminograma difirió de los amamantados, sobre todo en los aminoácidos treonina y los ramificados valina, leucina e isoleucina que estaban en exceso respecto a los niños alimentados con leche humana. La fórmula con 1,6gr de proteína exageró las diferencias y por el mencionado índice los autores especulan que recibían proteína en exceso. Se notaron diferencias significativas en la ganancia de peso y de longitud corporal en el grupo que recibió más proteína vs los amamantados ($p>0.05$) y los que recibieron la fórmula con menor contenido en proteína entre la semana 2 y 12 del estudio.

Debe ser tenido en consideración que la composición aminoacídica de la caseína de la leche de vaca es diferente de la caseína de la leche humana, y que el suero de ambas fuentes es muy diferente (Picone y col, 1989) por lo que es absolutamente imposible crear una proteína con una composición en aminoácidos idéntica a la proteína de la leche humana. Aun cuando fuese posible, la digestibilidad y absorción de tal fórmula diferiría sin dudas de la de la leche humana, resultando en diferentes patrones de aminoácidos plasmáticos.

En una revisión realizada por Lönnerdal y Zetterstrom (1988) concluyen que para lograrlo se requerirían fórmulas con una concentración de proteínas menor de 1,2 g/dl, lo cual es riesgoso dada las diferencias en calidad de las proteínas de las fórmulas y la forma en que pueden afectarlas los tratamientos térmicos.

Los requerimientos de proteína de los niños alimentados con fórmulas seguramente serán superiores a los de los alimentados con leche humana, aun considerando su contenido en NNP. Un estudio de Waterlow (1960) demostró un 17% mayor retención de Nitrógeno en niños alimentados con leche ma-

terna, aun cuando no difirieran la absorción y el aumento de peso entre ambos grupos. En este estudio no pudo medirse la composición del aumento de peso.

Evacuación gástrica en fórmulas basadas en proteínas del suero o caseína

Uno de los temores para el empleo de fórmulas con proteína de leche de vaca sin modificar ha sido la aparición de lactobezoares atribuidos a la formación de coágulos de caseína con la acidez del medio gástrico, que no ocurrirían con las fórmulas basadas en suero (Bocaccio C, O'Donnell AM (1979), La gran mayoría de los casos ocurrieron en prematuros o en recién nacidos de término de bajo peso. En realidad la causa más aceptada hoy para la formación de lactobezoares es la lenta evacuación gástrica de los prematuros en relación a niños de término y de más edad.

En un estudio realizado por nuestro grupo (Abeyá y col, 1980) la evacuación gástrica en prematuros alimentados, con una fórmula basada en suero ó en proteína de leche de vaca sin modificar, fue igual en todos los casos. La evacuación gástrica fue estimada por el método de George usando polietilenglicol. Otro estudio realizado por Thorkelsson y col (1994) empleando tecnecio y gamma cámara llegó a las mismas conclusiones. Tolia y col (1992) no encontraron diferencias en reflujo gastroesofágico en niños alimentados con fórmulas a base de proteína de suero o de caseína.

CONCLUSIONES

Desde el último informe FAO-OMS de 1985 sobre requerimientos de proteína y aminoácidos numerosos progresos en el conocimiento pueden contabilizarse, derivados del desarrollo de metodologías experimentales más precisas. Se ha confirmado a la proteína de la leche humana como patrón de referencia para el primer semestre de la vida y de los nuevos patrones de referencia sobre velocidad de crecimiento y tamaño corporal de los niños amamantados. De esta manera, el requerimiento proteico expresado por Kg/día es sustancialmente menor que el estimado en el informe de 1985; la estimación de los requerimientos de aminoácidos esenciales por Kg/día no ha variado, esperándose nueva información proveniente de estudios de cinética con aminoácidos marcados.

En relación a la forma más adecuada para proveer los requerimientos de proteína a los niños de esta edad que no son amamantados, por todo lo expuesto resulta obvio que es imposible pretender reproducir de manera idéntica el patrón de aminoácidos de la leche humana, a partir de proteínas de leche de vaca o de soja.

Las diferencias entre el patrón de aminoácidos plasmáticos inducido por fórmulas basadas en

proteína de leche de vaca, con predominio de caseína; respecto de la leche humana es dependiente de la concentración de proteína en las fórmulas (en g/dl o g/100 Kcal), y no del tipo de proteína predominante, caseína o suero. Las fórmulas que contienen entre 1,3 y 1,5 g/dl son las que producen el patrón aminoácido más parecido al de la leche de madre, aunque por razones de calidad proteica y digestibilidad la segunda concentración tiene un margen de seguridad mayor, sin representar riesgo de sobrecarga aún para los recién nacidos de término.

Las fórmulas basadas en la relación 40:60 tienen lugar en la alimentación de recién nacidos de pretérmino o de bajo peso, al menos durante el primer mes de vida, en razón de su mayor contenido en cisteína, precursor de la metionina y de la taurina, además de triptofano. Pasado este período y en recién nacidos y lactantes normales no hay fundamentos para recomendar su empleo basándose en consideraciones de origen de la proteína.

Al margen, como resultado de esta revisión, nos impresiona la escasez de estudios en la literatura más reciente sobre un tema que tiene implicancias para la salud de los niños más pequeños, la economía de sus familias y del sistema sanitario, persistiendo conceptos de dudosa vigencia. ¿Será que el redescubrimiento de la lactancia materna y el extraordinario resurgimiento de su práctica ha quitado el interés sobre los requerimientos nutricionales de los niños más pequeños? ¿Será que no se apoyan investigaciones sobre este tema y en esta edad porque que las fórmulas de "inicio" son más costosas y de alguna manera representan un reemplazo sofisticado al mejor alimento de los niños que es la leche materna, calmando conciencias culposas por no haber amamantado, madres y pediatras?

LECTURA RECOMENDADA

- Abeyá E, Spinelli S, Tavonaska J, O'Donnell AM: El vaciamiento gástrico de niños prematuros con leche humana y diferentes fórmulas lácteas. *Rev Hosp Niños* 1980; 22: 271.
- American Academy of Pediatrics: Breast feeding and the use of human milk. *Pediatrics* 1997;100:1035-1039.
- Bernbaum JC, Sasanow SR, Churella HR, Daft A: Growth and metabolic response of premature infants fed whey- or casein-dominant formulas after hospital discharge. *J Pediatr* 1989; 115: 652-656.
- Bier D: Intrinsically difficult problems: the kinetics of body proteins and aminoacids in man *Diabetes Metab Rev* 5:111, 1989.
- Bocaccio C, O'Donnell AM: Lactobezoar en un niño prematuro. *Rev Hosp Niños* 1979; 21:214.
- Bernbaum JC, Sasanow SR, Churella HR, Daft A: Growth and metabolic response of premature infants fed whey- or casein-dominant formulas after hospital discharge. *J Pediatr* 1989; 115: 652-656.
- Butte NF: The role of breastfeeding in obesity. *Pediatr Clin North America* 2001; 48:189-198.
- Butte N, Garza C, O'Brien, Nichols B: Human milk intake and growth of exclusively breast fed infants. *J Pediatr* 1984;104:187-195.
- Cooke RJ, Watson D, Werkman S, Conner C: Effects of type of dietary protein on acid-base status, protein nutritional status, plasma levels of amino acids, and nutrient balance in the very low birth weight infant. *J Pediatr* 1992; 121: 444-451.

- Davidson LA, Lönnerdal B: Fecal α -1-antitrypsin in breast-fed infants is derived from human milk and is not indicative of enteric protein loss. *Acta Paediatr Scand* 1990; 79: 137-141.
- Fomon S: Requirements and recommended dietary intakes of protein in infancy. *Pediatr Res* 1991; 30: 391-395.
- Fomon SJ, Haschke F, Ziegler EE, Nelson SE: Body composition of reference children from birth to age ten years. *Am J Clin Nutr* 1982; 35: 1169-75.
- Fomon SJ, Ziegler EE, Filer LJ Jr, Nelson SE, Edwards BB: Methionine fortification of a soy protein formula fed to infants. *Am J Clin Nutr* 1979; 32: 2460-71.
- Fomon SJ, Thomas LN, Filer LJ Jr, Anderson TA, Bergmann KE: Requirements for protein and essential amino acids in early infancy. Studies with a soy-isolate formula. *Acta Paediatr Scand* 1973; 62: 33-45.
- Fomon SJ, Bier OM, Matthews DE, et al: Bioavailability of dietary urea N in the breast-fed infant. *J Pediatr* 1988; 113: 515-20.
- Hay WW Jr, Lucas A, Heird WC, Ziegler E, Levin E, Grave GD, Catz CS, Yaffe SJ: Workshop summary: nutrition of the extremely low birth weight infant. *Pediatr* 1999; 104: 1360-8.
- Holt LE, Snyderman SE: The aminoacid requirements of infants. *JAMA* 1961;175:100-113.
- Huang PC, Lin CP, Hsu YP: The protein requirements of normal infants at the age of about one year: Maintenance nitrogen requirements and obligatory nitrogen losses. In: *Protein requirements in developing countries; evaluation of new data*. Eds: B Torún, V young and W rand. pp 169-171. Tokyo. United Nations University. 1981.
- Institute of Medicine/National Academy of Sciences: Nutrition during lactation. Washington, National Academy Press, 1991.
- Janas LM, Picciano MF, Hatch TF: Indices of protein metabolism in term infants fed human milk, whey-predominant formula, or cow's milk formula. *Pediatrics* 1985; 75: 775-784.
- Janas LM, Picciano MF: Quantities of amino acids ingested by human milk-fed infants. *J Pediatr* 1986; 109: 802-7.
- Kashyap S, Forsyth M, Zucker C, Ramakrishnan R, Dell RB, Heird WC: Effects of varying protein and energy intakes on growth and metabolic response in low birth weight infants. *J Pediatr* 1986; 108: 955-963.
- Kashyap S, Schulze KF, Forsyth M, et al: Growth, nutrient retention, and metabolic response in low birth weight infants fed varying intakes of protein and energy. *J Pediatr* 1988; 113: 713-721.
- Kashyap S, Schulze KF, Forsyth M, Dell RB, Ramakrishnan R, Heird WC: Growth, nutrient retention, and metabolic response of low-birth-weight infants fed supplemented and unsupplemented preterm human milk. *Am J Clin Nutr* 1990; 52: 254-262.
- Kashyap S, Okamoto E, Kanaya S, Zucker C, Abildskov K, Dell RB, Heird WC: Protein quality in feeding low birth weight infants: a comparison of whey-predominant versus casein-predominant formulas. *Pediatr* 1987.
- Kunz C, Lönnerdal B: Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk. *Acta Paediatr* 1992; 81:107-112.
- Kunz C, Lönnerdal B: Casein and casein subunits in preterm milk, colostrum, and mature human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990; 10: 454-461.
- Lönnerdal B, Zetterström R: Protein content of infant formula: how much and from what age? *Acta Paediatr Scand* 1988; 77: 321-325.
- Lönnerdal B, Chen CL: Effects of formula protein level and ratio on infant growth, plasma amino acids and serum trace elements. *Acta Paediatr Scand* 1990; 79: 257-65.
- Lucas A, Morley R, Cole TJ: Randomised trial of early diet in preterm babies and later intelligence quotient. *Br Med J* 1998; 317: 1481-1487.
- Lucas A: Nutrition, growth, and development of post discharge preterm infants. In: Hay WW Jr, Lucas A, eds. *Posthospital nutrition in the preterm infant*. Report of the 106 th Ross Conference on Pediatric Research. Columbus, OH: Ross products division, Abbott laboratories; 1996: 81-89.
- Lucas A, Morley R, Cole TJ, et al: Early diet in preterm babies and developmental status at 18 months. *Lancet* 1990; 335: 1477-1481.
- Lucas A, Morley R, Cole TJ, et al: Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. *Lancet* 1992; 339: 261.
- Menkes JH, Welcher DW, Levi HS, et al: Relationship of elevated blood tyrosine to the ultimate intellectual performance of premature infants. *Pediatrics* 1972; 42: 218-24.
- Mamunes P, Prince PE, Thornton NH, et al: Intellectual deficits after transient tyrosinemia in the term neonate. *Pediatrics* 1976; 57: 675-80.
- Picciano MF: Nutrient composition of human milk. *Pediatr Clinics of North America* 2001; 48: 53- 67.

- Picone TA, Benson JD, Moro G, Minoli I, Fulconis F, Rassin DK, Råihä NCR: Growth, serum biochemistries, and amino acids of term infants fed formulas with amino acid and protein concentrations similar to human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989; 9: 351-360.
- Priolisi A, Didato M, Gioeli R, Fazzolari-Nesci A, Råihä NCR: Milk protein quality in low birth weight infants: effects of protein-fortified human milk and formulas with three different whey-to-casein ratios on growth and plasma amino acid profiles. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 14: 450-455.
- Råihä NCR, Heinonen K, Rassin DK, Gaull GE: Milk protein quantity and quality in low-birth weight infants. I. Metabolic responses and effects on growth. *Pediatrics* 1976; 57: 659-674.
- Råihä NCR, Minoli I, Moro G: Milk protein intake in the term infant. I. Metabolic responses and effects on growth. *Acta Paediatr Scand* 1986; 75: 881-886.
- Råihä NCR, Minoli I, Moro G, Bremer HJ: Milk protein intake in the term infant. II. Effects on plasma amino acid concentrations. *Acta Paediatr Scand* 1986; 75: 887-892.
- Råihä NCR: Milk protein quantity and quality and protein requirements during development. *Adv Pediatr* 1989; 36: 347-368.
- Råihä NCR: Nutritional proteins in milk and the protein requirement of normal infants. *Pediatrics* 1985; 75: 136-141.
- Rosenvinge Skov A, Toubro A, Bülow J, Krabbe K, Parving H-H, Astrup A: Changes in renal function during weight loss induced by high vs low-protein low-fat diets in overweight subjects. *Int J Obes* 1999; 23: 1170-1177.
- Taylor YSM, Scrimshaw NS, Young VR: The relationship between serum urea levels and dietary protein utilization in young men. *J Nutr* 1974; 32: 407-412.
- Thorkelsson T, Mimouni F, Namgung R, Fernández-Ulloa M, Krug-Wispé S, Tsang RC: Similar gastric emptying rates for casein- and whey-predominant formulas in preterm infants. *Pediatr Res* 1994; 36: 329-333.
- Tolia V, Lin CH, Kuhns LR: Gastric emptying using three different formulas in infants with gastroesophageal reflux. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 15: 297-301.
- Waterlow JC: Protein requirements of infants: an operational assessment. *Proc Nutr Soc* 1990; 49: 499-506.
- WHO: Energy and protein requirements. Technical report series N° 724. Geneva: FAO/WHO/UNU, 1985; 64-112.
- Young VR, Pelletier VA: Adaptation to high protein intakes, with particular reference to formula feeding and the healthy, term infant. *J Nutr* 1989; 119: 1799-1809.
- Ziegler EE, O'Donnell AM, Nelson SE, Fomon SJ: Body composition of the reference fetus. *Growth* 1976; 40: 329-341.