

UNIVERSIDAD DE NAVARRA. FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA Y PUERICULTURA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Inmunogenicidad y dieta lactea *

F. Hermida

RESUMEN

Se realizó un estudio inmunolectroforético de los antígenos de leche de vaca, habiéndose encontrado un total de 26 que han podido ser identificados por su origen sérico, lactosérico o caseínico, así como por su movilidad electroforética relativa a la albúmina humana. Se propone un nuevo sistema de nomenclatura para ellos.

Se investigó también la composición antigénica de los preparados comerciales de leche en polvo más comúnmente empleados en dietética de lactantes sanos y enfermos, en nuestro medio y al comienzo de nuestras investigaciones. Se comprobó que todos ellos conservaban muchas de las fracciones antigénicas de la leche completa de vaca y pudo observarse así mismo como, en inmunolectroforesis de estos productos, desarrolladas frente al suero de enfermo sensibilizado a la leche, se formaban bandas de precipitación contra algunos de dichos antígenos, lo que evidenciaba su carácter antigénico para el niño.

Prescindiendo de los altos porcentajes de niños sanos y enfermos en los que se encuentran anticuerpos circulantes frente a la leche y cuyo significado real permanece oscuro, clínicamente se ha estimado que en la población infantil existe un 0,3 % a 7 % de sujetos sensibilizados a las proteínas de leche de vaca³, lo que hace que un número considerable de ellos

tenga que ser visto por el pediatra, planteando un arduo problema terapéutico a la hora de eliminar de su dieta los antígenos responsables de la sensibilización, puesto que la leche es un alimento difícilmente reemplazable en los primeros meses de la vida del niño.

Múltiples intentos se han hecho para precisar qué proteínas lácteas eran las causantes de la hipersensibilidad, en orden a buscar posibles procedimientos de destrucción de su poder alergénico. En la

* Resumen del trabajo presentado para obtener el grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Navarra.

actualidad, con divergencias entre los distintos autores^{2, 4, 11, 32, 35 y 36} y con las reservas propias de un incompleto conocimiento de la composición antigénica total de la leche, se admite que las fracciones más sensibilizantes son la seroalbúmina bovina, la caseína, la betalactoglobulina y la alfa lactalbumina. Pero que esta estimación es a todas luces insuficiente, se deduce del hecho de que tales proteínas no son en realidad únicas, sino complejos proteicos heterogéneos sometidos a mutuas interacciones de tipo fisicoquímico, habiéndose descrito la existencia de variantes genéticas para muchos de los mismos²⁹. Ello hace que sea realmente confusa la designación e identificación de las proteínas lácteas, porque ocurre además que en ocasiones se han dado nombres diversos a una proteína que cada uno de los diferentes autores creía haber descubierto, cuando en realidad se trataba de la misma sustancia en diverso grado de pureza o degradación.

Hasta tal punto esto es así, que la American Dairy Science Association (ADSA) ha creado un comité encargado de revisar la nomenclatura de estas proteínas para poner en claro la individualidad de cada una. Este comité en su segundo informe⁴⁶ han hecho una serie de recomendaciones en orden a la descripción de dichas sustancias, entre las que figura la especificación de la movilidad electroforética relativa, por ser éste un índice poco influenciado por las condiciones experimentales.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, nos pareció interesante aplicar el proceder inmunoelectroforético para detectar, de forma sencilla, el conjunto de antígenos presentes en la leche de vaca y leches en polvo adaptadas para lactantes, con el fin de comprobar posteriormente el comportamiento inmunogénico de dichos antígenos tanto en el animal de experimentación como en clínica infantil.

MATERIAL Y MÉTODOS

Antígenos.

Para la obtención de lactosuero y caseína se fraccionó, por el método de Schmidt y Payens⁴⁰, una mezcla de leche de 3 vacas suizas. La leche descremada se diluyó 3 veces en agua destilada, ajustando el pH a 4,6 con CIH 1 N. Bajo esta condición se produce un precipitado de micelas de caseína, que se separa del sobrenadante por centrifugación. El sedimento se lava 4 veces con tampón 4,6. Se consideró como caseína total el sedimento del último lavado. El lactosuero se obtuvo simultáneamente con la caseína, separando el primer sobrenadante y concentrándolo 3 veces. Tanto estos antígenos como la leche completa se desecaron por acetona y se liofilizaron, conservándolos en congelador a -20°C hasta su empleo.

Las leches en polvo estudiadas, eran productos comerciales de diferentes laboratorios, que tenían de común ser elaboradas por el proceso de "nebulización". Fueron distribuidas en los 3 grupos que se especifican en la tabla I.

TABLA I

DISTRIBUCION POR GRUPOS DE LAS LECHES COMERCIALES (L. C.) ESTUDIADAS

L. C. — A	A ₁ = Nido rojo *
	A ₂ = Nido azul *
	A ₃ = Lacto-anfimón **
	A ₄ = Premanfimón **
L. C. — B	B ₁ = Eledón azul *
	B ₂ = Eledón amarillo *
	B ₃ = Pelargón *
L. C. — C	C ₁ = Mater-anfimón **
	C ₂ = Lacto-vegava ***

* Nestlé

** Ulta

*** Wander

Inmunosueros.

Los inmunosueros antileche completa, antilactosuero y anticaseína se obtuvieron por inmunización de conejos machos, mediante 2 tandas de inoculación, la primera de las cuales estaba compuesta por 12 inyecciones de 32 mg de antígeno seco vehiculizado en 1 ml de coadyuvante incompleto de Freund. La segunda tanda, practicada después de 15 días de descanso, se componía también de 12 inyecciones subcutáneas de 64 mg de antígeno disuelto en 2 ml de coadyuvante.

Los antisueros de leches comerciales se obtuvieron de modo similar, pero fue necesario practicar 4 tandas de inoculación, compuestas las dos primeras de 10 inyecciones, la tercera de 4 y la última de 3; en cada inoculación se inyectaban 64 mg de antígeno seco disuelto en 2 ml de coadyuvante.

La marcha de la inmunización era controlada mediante inmunodifusión de Ouchterlony y sólo cuando por esta técnica se obtenía un título de anticuerpos de 1/16 o superior se practicaban las sangrías finales.

Sueros humanos.

Para estudiar los anticuerpos antileche en el suero de niños sanos y enfermos, se recogieron sueros de 128 niños con

alergopatías variadas, 42 niños sanos, 3 de sospechosos de alergia a la leche de vaca y 3 de niños con enfermedad celíaca genuina. Todos ellos fueron analizados por hemaglutinación pasiva, inmunodifusión e inmunolectroforesis.

Reacción de hemaglutinación pasiva.

Se realizó mediante la técnica de Boyden, modificada por otros autores^{24, 38, 41}, y se empleó para investigar la presencia de anticuerpos circulantes antileche en sueros humanos.

Test de doble difusión de Ouchterlony e inmunolectroforesis.

Para la doble difusión se utilizaron las técnicas de Crowl⁵ y Mansi²⁶, con ligeras modificaciones^{6, 7, 8, 31}. Para la inmunolectroforesis se siguió la modificación de Scheidegger³⁹ del método de Grabar y Williams^{14, 15}, a su vez con ligeras modificaciones de otros autores^{3, 7, 8}.

La prueba de Ouchterlony se empleó para control de inmunizaciones de conejo y para la búsqueda de precipitinas en sueros humanos. La inmunolectroforesis fue empleada para el análisis antigénico de las distintas leches y para la demostración de anticuerpos específicos en sueros humanos.

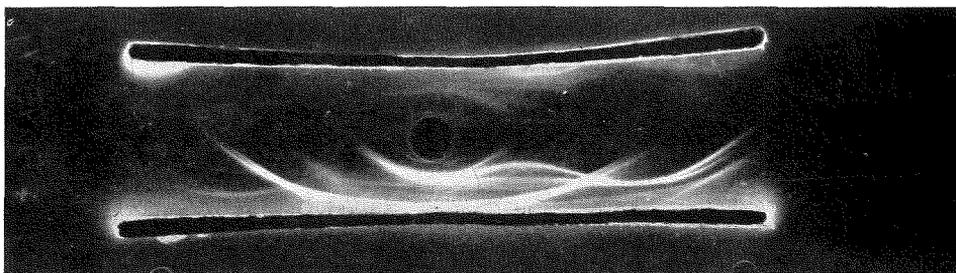


Fig. 1. Fotografía de una preparación de inmunolectroforesis de lactosuero desarrollada frente a inmunosuero homólogo (canal inferior) y a inmunosuero anticaseína (canal superior)

RESULTADOS

a) Patrón antigénico de leche de vaca.

Se hizo un estudio inmunoelectroforético de lactosuero, caseína y leche completa de vaca, para identificar los diferentes antígenos lácteos y determinar la movilidad electroforética de cada uno, tal como recomienda la ADSA ⁴⁶.

1. *Antígenos de lactosuero.* El análisis inmunoelectroforético de lactosuero frente a antilactosuero mostró 15 bandas de precipitación (fig. 1). Para facilitar la identificación de cada una, se construyeron los diagramas habituales en este tipo de trabajos, que recogen el conjunto de antígenos aparecidos en la serie de preparaciones estudiadas (fig. 2-A).

La inmunoelectroforesis de suero sanguí-

neo bovino frente a antilactosuero mostró 6 bandas comunes con el lactosuero (fig. 2-B), que desaparecían en las inmunoelectroforesis de lactosuero frente a inmunosuero homólogo absorbido con suero sanguíneo bovino (fig. 2-C), lo que demuestra que de los 11 antígenos que presenta el lactosuero, 6 son de origen sérico.

2. *Antígenos de caseína.* Investigaciones similares realizadas sobre caseína, mostraron la existencia de 14 componentes antigénicos (figs. 3 y 4-A), de las cuales una fue común con el suero de la vaca (fig. 4-B y C) y también con lactosuero.

3. *Comunidad antigénica de lactosuero y caseína.* Desarrollando inmunoelectroforesis de caseína frente a antilactosuero (fig. 5-A) y de lactosuero frente a caseína

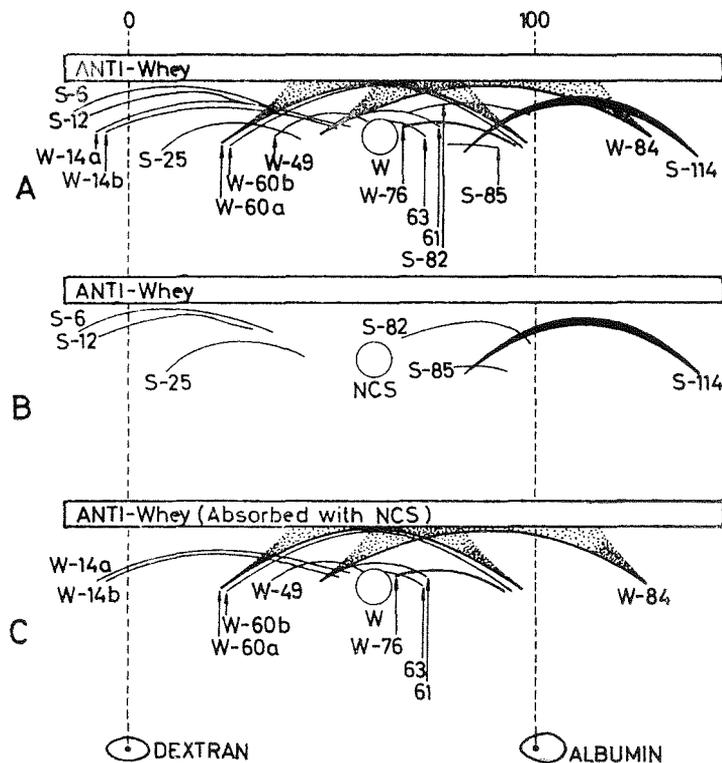


Fig. 2. A. Diagrama de las bandas de precipitación observadas en inmunoelectroforesis de lactosuero (W) frente a inmunosuero homólogo (ANTI-Whey).

B. Diagrama de las bandas de precipitación observadas en inmunoelectroforesis de suero de vaca normal (NCS) frente a antilactosuero (ANTI-Whey).

C. Diagrama de las bandas de precipitación observadas en inmunoelectroforesis de lactosuero (W) frente a inmunosuero homólogo absorbido con suero de vaca normal.

Las letras con que se designan las bandas (W y S) hacen referencia a su origen en lactosuero y suero sanguíneo de la vaca. Los números indican su movilidad relativa a la albúmina humana (10^{-2} Ux/U alb).

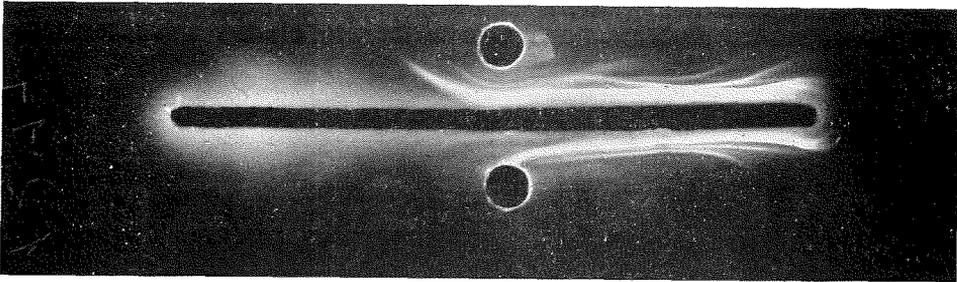


Fig. 3. Fotografía de una preparación de inmunoelectroforesis de caseína. 30 % (pocillo superior) y al 10 % (pocillo inferior) frente a inmunosuero homólogo 4 x (canal).

(fig. 5-C), se observó la formación de líneas de precipitación debido a la existencia de proteínas comunes, que desaparecen cuando se realizan las oportunas absorciones cruzadas (fig. 5-B y D). Estas bandas, que tenían una movilidad electroforética relativa de 61 y 63, aparecen tanto en inmunoelectroforesis de lactosuero como de caseína y en las pre-

paraciones cruzadas de ambas fracciones de leche, desapareciendo cuando se absorbe una fracción con otra. Ninguna de las dos se observó en el suero sanguíneo de vaca.

4. *Composición antigénica total de leche de vaca.* La leche completa mostró 26 antígenos de los cuales 6 proceden

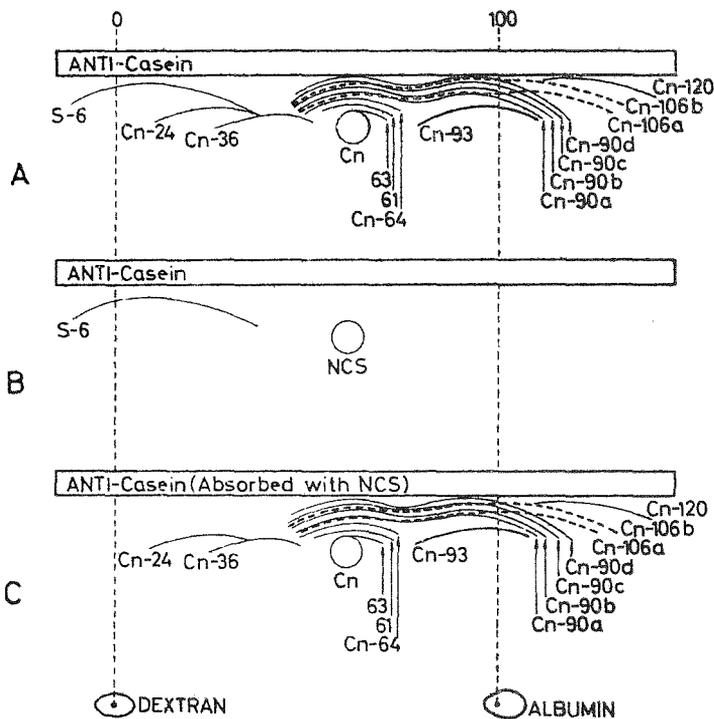


Fig. 4. A. Diagrama de las bandas de precipitación observadas en inmunoelectroforesis de caseína (Cn) frente a inmunosuero homólogo (ANTI-Casein)

B. Diagrama de las bandas de precipitación observadas en inmunoelectroforesis de suero de vaca normal (NCS) frente a anticaseína (ANTI-Casein)

C. Diagrama de las bandas de precipitación observadas en inmunoelectroforesis de caseína (Cn) frente a inmunosuero homólogo absorbido con suero de vaca normal.

Las letras con que se designan las bandas (Cn y S) hacen referencia a su origen en caseína y suero sanguíneo de la vaca. Los números indican la movilidad relativa a la albúmina humana (10^{-2} Ux/U alb).

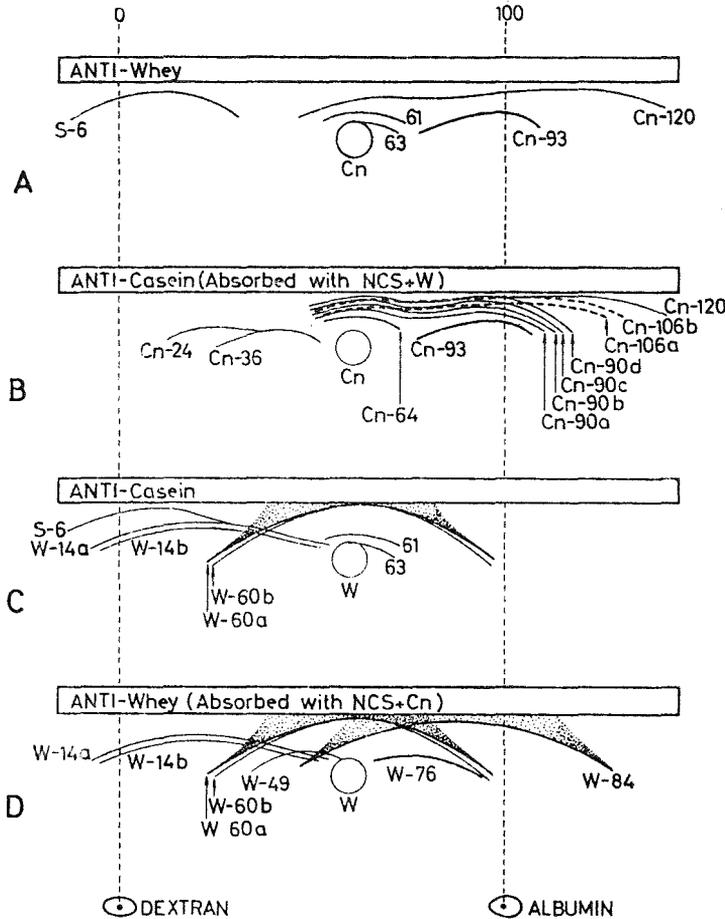


Fig. 5. A. Diagrama de las bandas de precipitación observadas en inmunoelectroforesis de caseína (Cn) frente a anti-lactosuero (ANTI-Whey).

B. Diagrama de las bandas de precipitación observadas en inmunoelectroforesis de caseína (Cn) frente a inmunosuero homólogo absorbido con suero de vaca normal y lactosuero.

C. Diagrama de las bandas de precipitación observadas en inmunoelectroforesis de lactosuero frente a anti-caseína.

D. Diagrama de las bandas de precipitación observadas en inmunoelectroforesis de lactosuero frente a inmunosuero homólogo absorbido con suero de vaca normal y caseína.

del suero sanguíneo, 7 pertenecen a lactosuero, 11 a la caseína y 2 son comunes a lactosuero y caseína pero no aparecen en el suero sanguíneo bovino.

5. *Nomenclatura propuesta para la designación de las bandas antigénicas de leche de vaca.* Se siguió un sencillo sistema de nomenclatura, consistente en la especificación de si pertenecen al suero, lactosuero o caseína, mediante las letras S, W y Cn (iniciales en inglés de las tres referidas fracciones), seguidas de una cifra que hace referencia a su movilidad electroforética relativa y, en algunos casos, de las letras a, b, c y d, para dife-

renciar entre sí aquellas bandas que teniendo igual procedencia y movilidad relativa se sitúan más o menos próximas al canal. En la tabla II se recogen todos los antígenos denominados según esta sistemática.

b) **Patrón antigénico de leches comerciales en polvo.**

Conocida la composición antigénica de la leche de vaca, interesaba determinar cuáles de sus antígenos desaparecían, se alteraban o permanecían iguales, después de los tratamientos industriales a que es

T A B L A II

Denominación de las bandas	Movilidad electroforética		Glicoproteínas	Componentes antigénicos	
	Relativa 10 ⁻² Ux/ U alb.	Absoluta 10 ⁻⁵ cm ² / V. seg.		Lactosuero	Caseína
S-6	6	1.8		X	X
S-12	12	2.0		X	
W-14a	14	2.1		X	
W-14b	14	2.1		X	
Cn-24	24	2.6			X
S-25	25	2.6		X	
Cn-36	36	3.1			X
W-49	49	3.7		X	
W-60a	60	4.2		X	
W-60b	60	4.2		X	
61	61	4.2		X	X
63	63	4.3	X	X	X
Cn-64	64	4.4			X
W-76	76	4.9		X	
S-82	82	5.2	X	X	
W-84	84	5.3		X	
S-85	85	5.3		X	
Cn-90a	90	5.6	X		X
Cn-90b	90	5.6	X		X
Cn-90c	90	5.6	X		X
Cn-90d	90	5.6	X		X
Cn-93	93	5.7			X
Cn-106a	106	6.3			X
Cn-106b	106	6.3			X
S-114	114	6.6		X	
Cn-120	120	6.9			X

sometida la leche de vaca para la obtención de los preparados en polvo.

Para ello, se investigó en cada uno de los preparados ensayados, la presencia de antígenos séricos, lactoséricos y caseínicos de la leche completa, así como la de antígenos nuevos, es decir, de aquellos que no aparecen en leche de vaca y que son el resultado de agregar a la misma determinadas sustancias para enriquecerla en valor nutritivo. Esta determinación se realizó estudiando las bandas de precipitación que aparecían en inmuno-

electroforesis de cada preparado frente a: 1) antisuero de vaca para conocer los antígenos séricos, 2) antilactosuero de vaca absorbido con suero sanguíneo de vaca para determinar antígenos lactoséricos, 3) anticaseína absorbido con suero sanguíneo de vaca para determinar antígenos anticaseínicos y 4) inmunosuero homólogo absorbido con leche completa de vaca para comprobar la existencia de antígenos nuevos.

Las figuras 6, 7 y 8 muestran los antígenos lácteos y nuevos que se encontra-

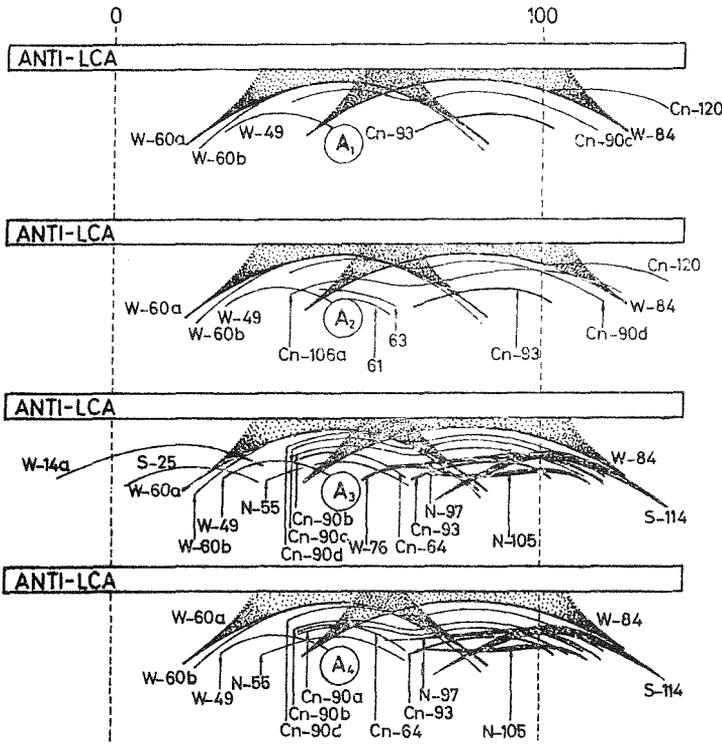


Fig. 6. Diagrama de las bandas de precipitación observadas en los preparados del grupo LC-A, frente a los inmunoseros homólogos.

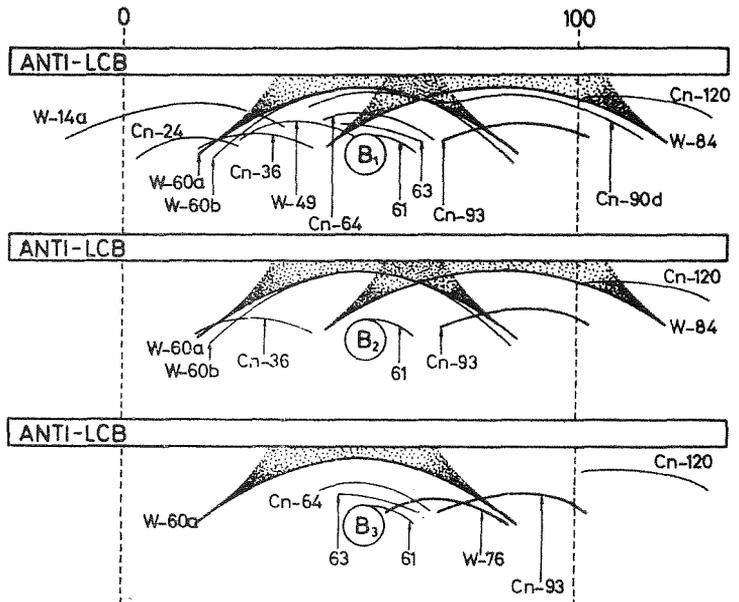


Fig. 7. Diagrama de las bandas de precipitación observadas en los preparados del grupo LC-B, frente a los inmunoseros homólogos.

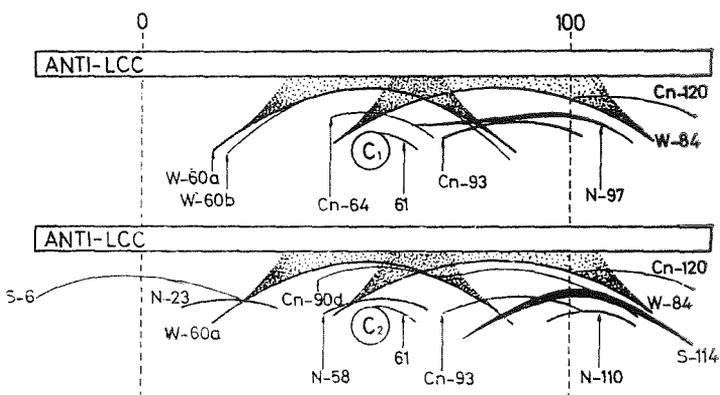


Fig. 8. Diagrama de las bandas de precipitación observadas en los preparados del grupo LC-C, frente a los inmunosueros homólogos.

ron en los preparados de los tres grupos. Como puede observarse todos los preparados contenían un mínimo de 7 bandas antigénicas. Siendo la Cn 93 y W 60 a comunes a los 9 productos ensayados. Así mismo es de notar la presencia de antígenos nuevos designados con la letra N, en los preparados A₃, A₁, C₁ y C₂.

c) Poder inmunogénico experimental de los preparados comerciales.

Se determinó estudiando en los sueros de las sangrías parciales, la cronología de aparición de anticuerpos específicos para los antígenos de las leches en polvo. Se consideraron como antígenos más inmunogénicos aquellos que más precozmente daban lugar a la formación de anticuerpos.

En la tabla III, se recoge la secuencia de aparición de dichos anticuerpos, a lo largo de las sangrías parciales más próximas a la basal. Las bandas aparecidas en la sangría 1, fueron para el grupo anti LC-A, las W-14a, Cn-64, Cn-93 y Cn-120; para el grupo LC-B fueron todos los anteriores de anti LC-A, más la Cn-24, W-60a y W-60b; y para anti LC-C, sólo la W-14a, Cn-64 y Cn-93.

Pero solamente, W-14a, Cn-64 y Cn-93, eran los 3 elementos antigénicos, que da-

ban lugar a respuesta inmunológica en la primera sangría siguiente a la basal, en todas las leches en polvo estudiadas.

d) Antigenicidad de las leches en polvo en clínica infantil.

Se investigó por hemaglutinación pasiva, la presencia de anticuerpos circulantes frente a leche de vaca en 176 sueros de niños, de los cuales 128 padecían diversos cuadros alérgicos, 42 no presentaban alergopatía alguna, 3 eran sospechosos de alergia a leche de vaca y 3 correspondían a niños con enfermedad celíaca comprobada. Fue precisamente en este grupo (tabla IV) donde los títulos fueron más altos, alcanzando en unos de los pacientes celíacos valores de 1/162,240.

Todos los sueros con título de hemaglutinación superior a 1/5,120, fueron estudiados por inmunodifusión e inmunoelectroforesis. Solamente daba reacción de Ouchterlony fuertemente positiva (fig. 9) y presencia de bandas identificables por inmunoelectroforesis el suero, con título de hemaglutinación de 1/162,240, que correspondía a una niña de 16 meses de edad que tenía una enfermedad celíaca genuina histológicamente comprobada. Esta enfermita ofrecía la particularidad de presentar una prueba cutánea positiva (++) a la le-

TABLA III
PODER INMUNOGENICO EXPERIMENTAL DE LOS ANTIGENOS LACTICOS

	Sangría 1			Sangría 2			Sangría 3		
	LC-A	LC-B	LC-C	LC-A	LC-B	LC-C	LC-A	LC-B	LC-C
S-6									
S-12									
W-14a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
W-14b								+	
Cn-24		+			+			+	
S-25									
Cn-36									
W-49									
W-60a		+			+	+	+	+	+
W-60b		+			+	+	+	+	+
61									
63									
Cn-64	+	+	+	+	+	+	+	+	+
W-76									
S-82									
W-84				+			+	+	
S-85									
Cn-90a									
Cn-90b									
Cn-90c									
Cn-90d									
Cn-93	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cn-106a									
Cn-106b									
S-114									
Cn-120	+	+		+	+	+	+	+	+

TABLA IV

Número de sueros	TITULO DE HEMAGLUTINACION										
	< 1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2.560	1/5120	1/10240	1/20480	1/160240
No alérgicos	42	7	3	5	3	4	6	2	3	4	
Alergopatías diversas (predominantemente respiratorias)	128	30	11	11	20	15	13	12	2	5	
Alergia a la leche.	3							1	1		1
Enfermedad celíaca	3								1		1

che de vaca y negativa al gluten, manifestando una clara intolerancia digestiva a éste, así como a la leche de vaca y

demás leches en polvo, habiendo sido descartado analíticamente cualquier intolerancia para los disacáridos.

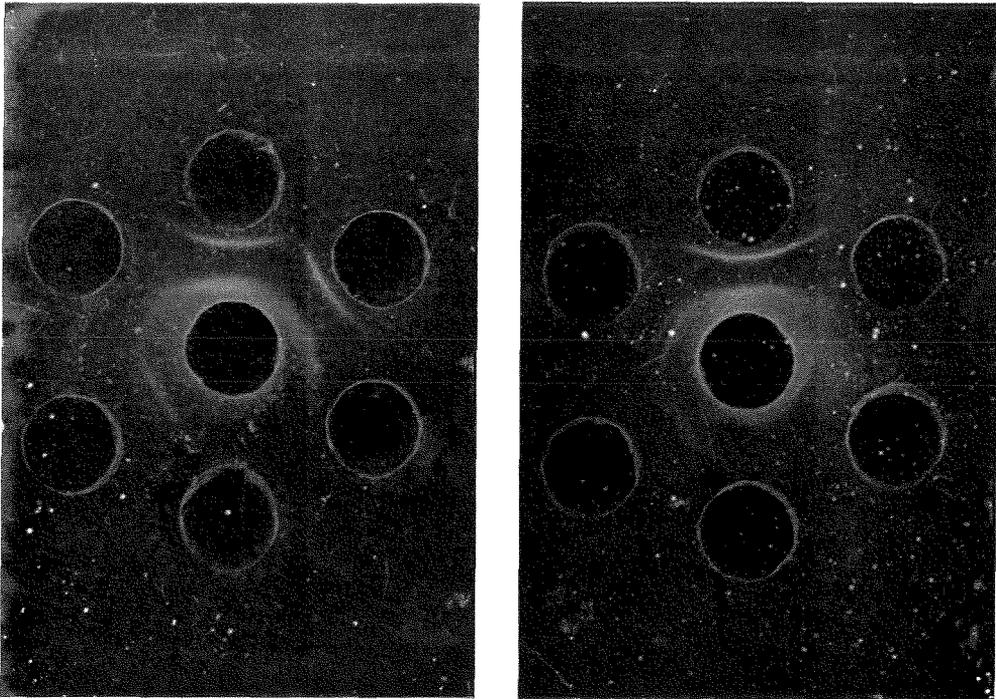


Fig. 9. Izquierda.—Inmunodifusión del suero del paciente celíaco al 1/1 (centro) frente a leche entera de vaca 10 %, 5 %, A₁, A₂, A₃ y A₄ 10 % (periferia). Derecha.—Inmunodifusión del mismo suero (centro) frente a leche entera de vaca 10 %, B₁, B₂, B₃, C₁ y C₂, al 10 % (periferia).

En la inmunolectroforesis de leche de vaca y de las leches en polvo ensayadas, se formaron frente al suero de esta niña arcos de precipitación (fig. 10) que por su origen, morfología y movilidad relativa, se identificaron con W-14a, W-60a, Cn-64 y Cn-93.

DISCUSIÓN

El análisis inmunolectroforético ha permitido identificar un considerable número de componentes antigénicos en leche completa de vaca y en leches comerciales en polvo. Este método ofrece la ven-

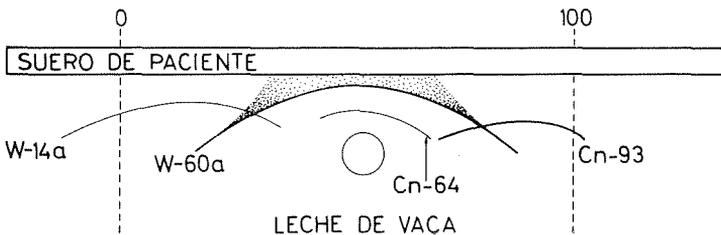


Fig. 10. Diagrama de los antígenos lácticos contra los que se objetivaron anticuerpos en el suero humano.

taja de mostrar no sólo la movilidad electroforética de cada proteína, sino que también permite individualizar las proteínas que ocupan una misma región electroforética.

a) Antígenos de la leche de vaca.

1. *Proteínas comunes con el suero sanguíneo.*

Se encontraron en total 6 proteínas de la leche comunes con el suero de la vaca. Una de ellas, la denominada S-6, aparecía tanto en lactosuero como en caseína y puede corresponderse con la euglobulina descrita en 1958 por Murthy y Whitney³⁰ con una movilidad absoluta de 1,8, idéntica a la constatada en el presente trabajo.

Las cinco proteínas restantes, comunes con el suero, se evidenciaron siempre en la fracción lactosérica. Entre ellas, la S-114 se identificó con la albúmina sérica por su morfología, situación electroforética (Hanson y Johanson¹⁹) y movilidad absoluta de 6,6, muy próxima a la encontrada por Polis y cols.³⁴ de 6,7 para esta proteína.

La banda S-12, puede corresponderse con la β_2 A-globulina del suero de la vaca, identificada por Blanc¹ en el lactosuero con una movilidad absoluta comprendida entre 1,8 y 2,2 por electroforesis sobre gel de agar, y para la que se encontró en esta investigación, una movilidad absoluta de 2, determinada también en electroforesis de agar.

La S-25, con una movilidad absoluta de 2,6, no la encontramos descrita en la literatura. Es una banda muy pequeña que hace pensar que la leche la contenga en escasa cantidad.

Tampoco ha sido descrita ninguna proteína sérica en la región en que encontramos la S-82-glicoproteína y la S-85 con movilidades absolutas en gel de agar

de 5,2 y 5,3 respectivamente. En lo referente a la S-82, quizá pueda pensarse en su equivalencia con una glicoproteína que aparece en el área α -2 del suero humano que Grabar y Burtin¹³, describen con una movilidad absoluta en electroforesis de agar de 5,1. Para la S-85 ha sido absolutamente imposible encontrar ninguna equivalencia en la bibliografía revisada.

En este trabajo no ha sido posible evidenciar ninguna proteína sérica que se corresponda con la ceruloplasmina descrita también por Blanc¹ en lactosuero con una movilidad absoluta en gel de agar de 4,6. Por su morfología asimétrica y por la movilidad absoluta de 4,3, podría corresponderse con la que nosotros denominamos glicoproteína 63, que tanto aparece en caseína como en lactosuero, pero el hecho de no poder detectarla nunca en el suero invalidaría dicha equivalencia, salvo que en su transporte del plasma a la leche se modifique antigénicamente. De modo similar la 61, que no aparece en suero y sí en lactosuero y caseína, tiene las características de la transferrina, proteína roja de la leche descrita por Blanc¹ con una movilidad electroforética absoluta de 3,6, y para la que nosotros encontramos una movilidad de 4,2. Como quiera que se han descrito varias proteínas rojas en la leche, todavía no se conoce exactamente cuáles son idénticas a las del plasma²⁹. Posiblemente cuando se haga constar la movilidad relativa de todas ellas pueda esclarecerse este punto.

2. *Proteínas de lactosuero.*

Aparecieron 7 proteínas exclusivas de lactosuero. De ellas la W-14 a, se corresponde con la pseudoglobulina de la nomenclatura clásica, término que debe ser desechado y sustituido por el genérico de inmunoglobulina hasta tanto no se sepa exactamente a qué tipo corresponde²⁹, habiendo sido descrita por diver-

Los autores^{1, 30}, con una movilidad absoluta de 2, muy próxima a la encontrada por nosotros de 2,1. La W-14 b era una banda exactamente paralela a la W-14 a, de situación ligeramente más baja, pudiendo tratarse de un variante genético de la anterior.

La W-49, de movilidad absoluta 3,7 en gel de agar, corresponde a la lactotransferrina descrita por Groves¹⁶ y confirmada por Blanc¹ con una movilidad absoluta de 3 en electroforesis de agar.

La W-60 a, tiene una movilidad absoluta en gel de agar de 4,2, similar a la descrita por Gordon y Smett¹² como alfa-lactalbúmina. Su morfología era típica, tanto en intensidad, como en amplitud y simetría. Constantemente hemos observado un desdoblamiento de esta banda, a la que denominamos W-60 b.

La W-84 era otra proteína que el lactosuero contenía en gran cantidad, a juzgar por su marcada intensidad. Tenía una movilidad absoluta de 5,3, que correspondía a una proteína de igual movilidad, referida por el comité de la ADSA (Thompson y cols.⁴⁶) como la clásica beta-lactoglobulina. Blanc¹ la encuentra también con movilidad y morfología idénticas.

Existía también en lactosuero otra banda, W-76, a la que no pudimos encontrar posible equivalencia en la bibliografía.

3. *Proteínas de la caseína.*

Se encontraron 11 bandas de precipitación, correspondientes a otras tantas proteínas propias de la caseína.

La Cn-24, con movilidad absoluta de 2,6 en gel de agar, parece corresponderse con la γ -caseína clásica descrita por Jennes y cols.²² con una movilidad absoluta de 2 en electroforesis de tubo en U, y la Cn-36 a la β -caseína.

Los patrones inmunoelectroforéticos de las α -caseínas, a las que en electroforesis de tubo en U se les atribuye una movilidad absoluta de 6,7 (Jennes y cols.²²), resultaron extraordinariamente complejos. Nosotros encontramos por inmunoelectroforesis ocho bandas correspondientes a α -caseínas. Cuatro de ellas fueron identificadas como α -caseínas (Cn-90 a, Cn-90 b, Cn-90 c, y Cn-90 d) al comprobar mediante tinción, que se trataba de glicoproteínas, ya que son las únicas caseínas que contienen glúcidos (Jolles²³). Las cuatro que tenían la misma movilidad relativa de 90, presentaban también un trazado absolutamente paralelo y sólo era posible visualizarlas todas cuando se alcanzaban las proporciones óptimas de antígeno-anticuerpo. La Cn-93 difería de las anteriores no sólo por su movilidad relativa, sino también por su morfología más intensa pero menos alargada y sin la forma característica de guirnalda, pudiendo corresponderse con una de las múltiples α -caseínas. La Cn-106 a, Cn-106 b y la Cn-120, de movilidades absolutas comprendidas entre 6,3 y 6,9 creemos equivalen a las variantes genéticas (A, B y C) de las α_{SI} -caseínas descritas por Thompson y cols.^{42, 43, 44 y 45} y aceptadas por el comité de la ADSA.

Además de las diez caseínas mencionadas existía una de movilidad absoluta 4,4, la Cn-64, que debe corresponderse con una de las múltiples caseínas descritas como caseínas delta, landa, etc., pero que no pudimos correlacionarla con ninguna.

4. *Antígenos totales de la leche de vaca.*

Comparando nuestro hallazgo, de 26 líneas de precipitación inmunoelectroforéticas en leche de vaca, con los de otros autores que se han ocupado del tema, encontramos que Hanson y Johanson¹⁹ refieren haber objetivado 12 bandas en preparaciones de leche de vaca frente a suero antileche. La posibilidad de evi-

denciar mayor número de bandas está vinculada, a parte de otras circunstancias, al hecho de trabajar separadamente con fracciones de la leche, como lo demuestran entre otros, los trabajos de Masoero y cols.²⁷ y Blanc¹, quienes operando sólo con lactosuero frente a antilactosuero encuentran 12 y 9 bandas respectivamente, en esta fracción láctica. De otra parte Garnier y cols.¹⁰ trabajando con caseína e inmunosuero específico, encuentran 7 bandas inmuno-electroforéticas. Asimismo estudios comparativos del suero bovino, de leche de vaca y de sus fracciones permitieron precisar que la leche contenía de 10 a 15 antígenos séricos y de 7 a 8 propios. (Gugler y cols.¹⁷, Hanson y Manson²⁰). Por ello, nosotros hemos actuado siempre utilizando por separado dichas fracciones y nuestro resultado final se compone de la suma de los antígenos hallados en suero, lactosuero y caseína.

5. *Nomenclatura propuesta.*

Un sencillo sistema de denominación de las proteínas de la leche es la simple designación, cuando ello sea posible, de su pertenencia al suero (seric), lactosuero (whey) y caseína (casein) seguido de una cifra que exprese su movilidad electroforética relativa, propiedad que el comité de la ADSA (Thompson y cols.⁴⁶) y otros autores de gran relevancia en el campo de proteínas lacteas, como McKenzie²⁹ recomiendan con insistencia. Dicho sistema aparece recogido recientemente en una publicación de Martínez-Resa y col.²⁵.

b) **Antígenos de las leches comerciales en polvo.**

Prescindiendo de los antígenos no lácteos, de los 26 arcos de precipitación evidenciados en la leche entera de vaca, se identificaron por inmunolectroforesis de 7 a 13 en las distintas leches comerciales en polvo.

Hanson y Manson²⁰ encuentran 8 bandas antigénicas por inmunolectroforesis de leches en polvo pulverizadas ("spray") frente a inmunosueros anticualostro bovino. En 1965, Mauron y Blanc²⁸, investigando sólo proteínas de lactosuero encuentran también 7 bandas en leches "spray" y 12 en leches en polvo preparadas por liofilización.

Nuestros resultados coinciden en parte con los de los autores citados. Así, Mauron y Blanc²⁸, identificaron en leches "spray", no acidificadas, similares a los productos de los lotes A y C, α -lactalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina bovina y pseudoglobulina. Nuestras experiencias nos permitieron encontrar en estos tipos de preparados la banda W-60 a, que como antes se apuntó, se corresponde con la α -lactalbúmina; encontramos también una banda W-84 que se corresponde con la β -lactoglobulina. Pero sólo pudimos constatar la presencia de seroalbúmina (nuestra S-114) en A₃ y A₄, apareciendo también una S-25 en A₃. Nunca evidenciamos la banda W-14 a, correspondiente a la pseudoglobulina, salvo en A₃.

Los mismos autores, en leches acidificadas similares a los preparados B₁, B₂ y B₃, encuentran α -lactalbúmina en B₁ y β -lactoglobulina en los tres preparados, mientras que nosotros evidenciamos α -lactalbúmina en todos y β -lactoglobulina en B₁ y B₂. Dichos autores no investigaron en este tipo de leches la presencia de seroalbúmina ni de pseudoglobulina, mientras que nosotros hemos constatado la presencia de esta última banda (W-14 a) en B₁.

Hanson y Manson²⁰, no utilizan en su estudio leches acidificadas similares a las del grupo B, pero en preparados homólogos a los del grupo A y C encuentran dos bandas caseínicas, α -lactalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina bovina, débiles indicios de proteína roja e inmunoglobulinas. Por nuestra parte he-

mos encontrado siempre de tres a seis bandas correspondientes a caseína, una α -lactalbúmina, una β -lactoglobulina y sólo constatamos presencia de S-114 (correspondiente a seroalbúmina bovina) en A_3 y A_4 . En lo concerniente a proteínas rojas, objetivamos presencia de la banda 61 en A_2 y C_1 ; y de la banda W-49 en todos los preparados del grupo A. En el preparado A_3 pudimos objetivar la S-25, que como quedó dicho no la identificamos con ninguna de las clásicas proteínas de la leche, pero por tratarse de una γ -globulina pensamos pueda corresponder al grupo de las inmunoglobulinas.

Las diferencias encontradas entre preparados de un mismo laboratorio, no atribuibles en principio a la calidad proteica indicada por la casa preparadora, como sucede en B_1 y B_2 , pueden deberse a factores tales como el desnatado más o menos intenso, ya que como ocurre en el caso del B_2 prácticamente desgrasado, es posible que con la grasa se hayan arrastrado componentes proteicos. Si bien esto puede ser válido en determinados casos, no vale el mismo argumento para comprender porqué en una leche acidificada y completa como es B_3 , aparecen menos bandas que en otra acidificada y parcialmente desgrasada como B_1 . Pensamos que en estos casos tal diferencia puede deberse a que, precisamente por tratarse de una leche más completa, contenga mayor cantidad de proteínas que alteren la óptima proporción de antígeno/anticuerpo necesaria para producir precipitación. Además es necesario tener en cuenta qué proteínas que existan en pequeña cantidad en una leche comercial determinada, pueden no dar lugar a la formación de precipitados en la inmunoelectroforesis frente al antisuero homólogo. Por el contrario pueden evidenciarse líneas de precipitación cuando se desarrolla la inmunoelectroforesis de leche de vaca con el antisue-

ro del preparado comercial en cuestión, porque éste tiene anticuerpos en cantidad suficiente para reaccionar con el antígeno correspondiente que la leche de vaca contiene en cantidad mayor. Tal es el caso de la W-14 a, que no conteniéndolo ningún preparado del grupo LC-C, aparece en la primera sangría parcial de los conejos anti-LC-C al enfrentarse con leche entera de vaca. Se habla en estas circunstancias de antígenos en cantidad "maior", cuando aparecen directamente en la inmunoelectroforesis del preparado comercial con su antisuero homólogo; y "minor" cuando sólo se objetivan en inmunoelectroforesis de leche de vaca frente a inmunosuero de preparado comercial.

En lo que atañe a proteínas nuevas, es decir no encontradas en la leche completa de la vaca, parece claro que A_3 y A_4 presenten los mismos tres antígenos nuevos (N-55, N-97 y N-105), ya que se trata de preparados de un mismo Laboratorio y ambos son enriquecidos con una sustancia proteico-enzimática.

El preparado C_1 , siendo también de la misma casa que los dos anteriores y estando sometida a igual enriquecimiento proteico, sólo presentó uno de los tres antígenos nuevos (N-97). Parece verosímil imputar esta diferencia a alguna de las razones anteriormente mencionadas. El preparado C_2 mostró contener también antígenos nuevos (N-23, N-58 y N-110) que no se correspondieron con los encontrados en A_3 , A_4 y C_1 . Ello no es de extrañar, ya que pertenece a distinto Laboratorio y su adición proteica es diferente.

c) **Antigenicidad de las proteínas lácteas contenidas en las leches en polvo.**

Las publicaciones dedicadas a la antigenicidad experimental de la leche se reducen al estudio de los arcos de precipitación aparecidos en inmunoelectro-

foresis de leche de vaca y de sus derivados en polvo, frente a sueros de conejos inmunizados con las mismas (Hanson y Johanson¹⁹; Gugler¹⁷; Hanson y Manson²⁰; Roulet y cols.³⁷; Garnier y cols.¹⁰; Masoero y cols.²⁷; Blanc¹; Mauron y Blanc²⁸), pero no se encontró en toda la bibliografía revisada ningún trabajo que hiciese referencia a la cronología de aparición de anticuerpos en el conejo durante el curso de la inmunización con leche de vaca. Por ello nos pareció interesante estudiar los sueros de las sangrías parciales de los conejos, para determinar por inmunoelectroforesis qué antígenos eran los primeros en dar lugar a la formación de anticuerpos. En la primera sangría parcial, practicada a los 5 días después de la última inyección de la primera tanda de inoculaciones, se observaron en los conejos inmunizados con LC-A, LC-B y LC-C, las bandas de precipitación W-14 a, Cn-64 y Cn-93, de donde se deduce que las proteínas lácteas correspondientes son las de mayor antigenicidad. No obstante creemos que este poder antigénico no es igual para las tres mencionadas proteínas. En efecto, mientras la Cn-93 era un componente "maior" de todos los preparados de cada grupo, la W-14 a, sólo lo era para A₃ y B₁, pero en cambio daba lugar a respuesta inmunológica en los conejos de todos los grupos, ya en la primera sangría, es decir que presenta un alto poder inmunogénico, probablemente mayor que el de la Cn-93. Algo parecido debe ocurrir con la Cn-64, puesto que conteniéndola en cantidad "maior" sólo los preparados A₃, A₁, B₁, B₃ y C₁, dan lugar a la formación de líneas de precipitación en la primera sangría de los conejos de todos los grupos.

El componente lactosérico W-60 a, que lo contienen en cantidad "maior" todos los preparados de los tres grupos, parece tener bajo poder antigénico experimental, ya que sólo dio lugar a la apa-

rición de anticuerpos en la primera sangría del conejo anti-LC-B, no apareciendo en los restantes hasta la segunda o tercera sangría.

La antigenicidad, inducida espontáneamente en el niño por vía oral, de los antígenos lácteos, ha sido objeto de atención por parte de numerosos autores y siguiendo metodologías variadas.

Goldman y cols.¹¹, estudiando por medio de pruebas cutáneas, el suero de 89 niños con el diagnóstico clínico de intolerancia a la leche de vaca, encontraron que tras sobrecarga oral con la misma, las proteínas lácteas más alergénicas fueron la β -lactoglobulina (66 % de positividad), caseína (57 % de positividad), la α -lactalbúmina (54 % de posibilidades) y seroalbúmina bovina (51 %).

Rothberg y Farr³⁶, por medio de seroalbúmina bovina y de α -lactalbúmina marcadas con I¹³¹, encontraron alta incidencia de anticuerpos frente a estas sustancias en una muestra no seleccionada de 900 sueros, determinando que la frecuencia de anti-seroalbúmina bovina era mayor en niños que en adultos, pero no objetivaron diferencias con respecto a la anti- α -lactalbúmina. Otros autores (Ratner y cols.³⁵; Parish y cols.³²; Crawford y Grogan⁴; Cole y Dees²), no han podido encontrar diferencias, en lo que a poder alergénico se refiere, entre la caseína, la α -lactalbúmina y la β -lactoglobulina.

Peterson y Good³³, encontraron por hemaglutinación que de 288 sueros de niños con enfermedades variadas, el 67 % presentaba anticuerpos antileche y obtuvieron por inmunoelectroforesis de leche de vaca, bandas de precipitación frente a 5 sueros humanos, pero no identifican a qué antígenos son debidas. Heiner y cols.²¹, mediante doble difusión en gel de Crowle, encontró alto porcentaje de anticuerpos antileche, en enfermos celíacos.

Por nuestra parte la hemaglutinación pasiva aplicada a la selección de los sueros humanos fue altamente sensible, ya que merced a la misma pudimos detectar anticuerpos lácteos en la mayoría de los sujetos, incluso en algunos a títulos muy bajos. Esta frecuencia de anticuerpos circulantes frente a la leche, parece estar en relación con la permeabilidad intestinal en los primeros tiempos de la vida, que permite el paso de algunas proteínas poco o nada modificadas por el proceso digestivo (McKenzie²¹), lo cual da lugar a fenómenos de inmunorrespuestas frente a la misma. Teniendo esto en cuenta, se comprobó que en niños con procesos de malaabsorción intestinal (enfermedad celíaca, carencias o déficits enzimáticos, etc.), esta permeabilidad enteral se ve aumentada notablemente (Heiner y cols.²¹; Petterson y Good³³), siendo difícil precisar ante tales síntomas si la presencia de anticuerpos es la causa o la consecuencia de los mismos. No obstante, Fallstron y cols.⁹, apuntan la posibilidad de que la intolerancia a las proteínas de la leche de vaca pueden ser en realidad precursora de la enfermedad celíaca gluten-inducida. Pero por inmunoelectroforesis de leche de vaca y de leches comerciales, sólo pudimos evidenciar bandas de precipitación en uno de los sueros estudiados correspondiente a una niña con enfermedad celíaca. Estas bandas se identificaron como correspondientes a los antígenos W-14 a, W-60 a, Cn-64 y Cn-93 de nuestro sistema. Estos resultados se correspondían con los encontrados experimentalmente en el conejo, excepto en lo concerniente a la banda W-60 a que se había mostrado poco antigénica en el animal, ya que conteniéndola todas las fórmulas investigadas, sólo dio lugar a la aparición de anticuerpos en la primera sangría en el conejo anti-LC-B. Ello demuestra cómo la capacidad antigénica experimental no se corresponde exactamente con el poder sensibilizante que

estos antígenos pueden tener para el hombre por vía digestiva, aunque sí presentan notable paralelismo.

El hallazgo de anticuerpos en el niño frente a W-60 a (correspondiente a α -lactalbúmina) y de Cn-64 y Cn-93 (ambas caseínas) concuerda con los resultados de la mayoría de los investigadores que se ocuparon del tema y reafirman el poder antigénico atribuido a la caseína y α -lactalbúmina, pero permite además identificar con precisión a qué componentes de estas heterogéneas sustancias se debe esta antigenicidad. El hecho de no detectar en el niño arcos de precipitación frente a la seroalbúmina bovina y β -lactoglobulina, no excluye su antigenicidad, ya que es posible que nuestro enfermo no estuviese sensibilizado frente a las mismas.

Como quiera que todas las fórmulas lácticas estudiadas, contenían algunos de los antígenos que mostraron mayor poder sensibilizante, y todas contenían por lo menos Cn-93 y W-60 a, parece evidente que ninguna de ellas, pueden administrarse a pacientes con intolerancia a las proteínas en la leche. Futuras investigaciones deben dirigirse en busca de derivados de leche de vaca en los que sus proteínas hayan perdido su alergenidad, conservando su valor nutritivo, ya que en la actualidad sólo se dispone para la alimentación de estos niños, de preparados que, como se ha visto, son sensibilizantes o de fórmulas vegetales desequilibradas y de valor biológico insuficiente. Creemos además que los preparados hipoalergénicos que se obtengan en el porvenir deberán ser rigurosamente valorados por inmunoelectroforesis para garantizar de modo absoluto, su pretendida hipoalergenidad.

CONCLUSIONES

1. El análisis inmunoelectroforético, permitió identificar e individualizar 26 antígenos en leche de vacas.

2. Pudo comprobarse que 6 de éstos tenían un origen sérico.
3. Los 20 antígenos restantes eran de origen mamario, indicando con ello tanto la síntesis en la propia glándula como las modificaciones que ésta imprime a aquellas proteínas cuya procedencia sea extramamaria.
De ellos, 7 pertenecían a lactosuero, 11 a la caseína y 2 fueron comunes a ambas fracciones lácteas.
4. De todos los antígenos detectados por inmunoelectroforesis, 21 pudieron ser correlacionados con otros tantos referidos en la literatura e identificados por diversos autores mediante diferentes técnicas físico-químicas.
5. Se identificaron las bandas W-14 b, S-25, W-76, S-82 y S-85, debidas a proteínas cuya descripción no pudo localizarse en la bibliografía revisada.
6. Se propone un sistema de nomenclatura para designar las proteínas de la leche, haciendo referencia a su movilidad electroforética relativa. Asimismo en esta denominación se indica el origen sérico, lactosérico o caseínico de cada una de las bandas. Este sistema contribuye a resolver el problema de si proteínas descritas por diferentes autores y mediante técnicas diversas, son realmente idénticas o distintas entre sí.
7. El estudio antigénico, con inmunoseros homólogos, de 9 leches en polvo adaptadas para niños lactantes, evidenció que estos preparados conservaban proteínas inmunológicamente idénticas a las de la leche de vaca.
8. En los preparados enriquecidos con proteínas, se han detectado 6 bandas antigénicas que nunca habían aparecido en el análisis inmunoelectroforético de leche de vaca ni en las otras leches en polvo estudiadas.
9. No todos los antígenos lácteos contenidos en las leches en polvo, presentaron experimentalmente el mismo grado de poder inmunogénico, correspondiendo el máximo a W-14 a, Cn-64 y Cn-93.
10. La técnica de hemaglutinación pasiva mostró ser un método de gran sensibilidad para detectar, incluso a títulos bajos, anticuerpos circulantes frente a la leche en el suero humano.
11. Los niños con enfermedad celíaca y los sospechosos de alergia a la leche de vaca estuvieron comprendidos en los grupos de títulos más altos de hemaglutinación.
12. Sólo pudieron detectarse bandas de precipitación por inmunodifusión e inmunoelectroforesis, en el suero que por hemaglutinación dio el título más alto (1/160.240).
13. Este suero perteneciente a una niña con enfermedad celíaca, permitió identificar por inmunoelectroforesis los antígenos lácteos de las leches comerciales contra los que se forman anticuerpos. Dichos antígenos fueron W-14 a, W-60 a, C-64 y Cn-93.
14. El poder inmunogénico en el niño, por vía oral de las proteínas lácticas se correspondió con el encontrado experimentalmente en el conejo para los antígenos W-14 a; Cn-64 y Cn-93, pero además, mostró alto poder alergizante el W-60 a, que en el animal de experimentación no lo había manifestado.
15. Todas las fórmulas lácteas examina-

das contenían alguno de los componentes fuertemente inmunogénicos.

16. Los antígenos de alto poder alérgico correspondientes a las bandas Cn-93 y W-60 a, estaban presentes en todas y cada una de las leches en polvo. Por lo tanto ninguna de ellas, incluidas las adificadas B₁, B₂ y B₃, deben integrar la

dieta de niños con hipersensibilidad a las proteínas de la leche de vaca.

17. Se sugiere que el análisis inmuno-electroforético debe emplearse sistemáticamente para valorar cualquier fórmula hipoalérgica derivada de la leche de vaca, antes de ser recomendada como alimento de niños con hipersensibilidad a las proteínas lácteas.

SUMMARY

Inmunogenicity and milk diet

The number of antigenic components of cow's milk has been analyzed by immunoelectrophoresis. Twenty-six lines of precipitation were observed. Six of them were of serum origin, seven from whey, eleven from casein and two of undetermined origin. The electrophoretic mobility and some of the morphological and chemical characteristics are described. The comparative study of dried milk sam-

ples of commercially available baby-food products and cow's milk revealed extensive cross reactions. Finally, evidence was obtained by experiments of immunogel diffusion that sera from children hypersensitive to cow's milk developed at least four lines of precipitation when the sera were reacted against the commercial preparations.

BIBLIOGRAFÍA

1. BLANC, B. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias, Lausana. Ed. Medecine et Hygiene. Geneve, 1964.
2. COLE, W. Q. y S. C. DEES. *J. Pediat.*, 63: 256, 1963.
3. COLLINS-WILLIAMS, C. *Int. Arch. Allerg.*, 20: 38, 1962.
4. CRAWFORD, L. V. y F. T. GROGAN. *Pediatrics*, 28: 362, 1961.
5. CROWL, A. J. *J. Lab. & Clin. Med.*, 52: 784, 1958.
6. CHORDI, A. y I. G. KAGAN. *J. Immunol.*, 93: 439, 1964.
7. CHORDI, A. y I. G. KAGAN. *J. Parasitol.*, 51: 63, 1965.
8. CHORDI, A., K. W. WALLS y I. G. KAGAN. *J. Immunol.*, 93: 439, 1964.
9. FALLSTRÖM, S. P., J. WINBERG y H. J. ANDERSEN. *Acta Paediat. Scand.*, 54: 101, 1965.
10. GARNIER, J., B. RIBADEAU DUMAS y J. GAUTREAU. *Proc. XV Int. Dairy Congr. Copenhagen*, B 655, 1962.
11. GOLDMAN, A. S., D. W. ANDERSON, W. A. SELLERS, S. SAPERSTEIN, W. T. KNIDER y S. R. HALPERN. *Pediatrics*, 32: 425, 1963.
12. GORDON, W. G. y W. F. SEMMETT. *J. Am. Chem. Soc.*, 75: 328, 1953.
13. GRABAR, P. y P. BURTIN. *Analyse Immunoelectrophoretique*. Applications aux liquides biologiques humaines. Masson & Cie., 1960.
14. GRABAR, P. y C. A. WILLIAMS. *Biochem. Biophys. Acta*, 10: 193, 1953.
15. GRABAR, P. y C. A. WILLIAMS. *Biochem. Biophys. Acta*, 17: 67, 1955.
16. GROVES, M. L. *J. Am. Chem. Soc.*, 82: 3345, 1960.
17. GUGLER, E., M. BEIN y G. VON MURALT. *Schweiz. Med. Wochschr.*, 89: 1172, 1959.

18. GUNTHER, M., E. CHEEK, R. H. MATTHEWS y R. R. A. COOMBS. *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 21: 257, 1962.
19. HANSON, L. A. y B. JOHANSON. *Experientia*, 15: 377, 1959.
20. HANSON, L. A. y I. MANSON. *Acta Paediatrica (Upsala)*, 50: 434, 1961.
21. HEINER, D. C., J. W. SEARS y W. T. KNIKER. *Amer. J. Dis. Child.*, 103: 364, 1962.
22. JENESS, R., B. L. LARSON, T. L. McMEEKIN, A. M. SWANSON, C. H. WHITNAH y R. M. L. WHINEY. *J. Dairy Sci.*, 39: 536, 1956.
23. JOLLES, P. *Progress in the chemistry of casein. Angew. Chem. Internst. Edit.*, 5: 558, 1966.
24. LEWIS, U. P. y J. S. KESSEL. *Arch. Ophthalm.*, 66: 471, 1961.
25. MARTÍNEZ-RESA, P., C. ALVAREZ-MORENO, F. HERMIDA y A. CHORDI. *J. Dairy Sci.*, 52: 1, 1969.
26. MANSI, W. *Nature*, 181: 1289, 1958.
27. MASOERO, P., M. MILONE, C. AMBROSIANO, A. UBERTALLE y J. LIBERATORI. *Il mondo del latte*, 1: 3, 1962.
28. MAURON, J. y B. BLANC. *Nutritio et Dieta*, 7: 69, 1965.
29. MCKENZIE, H. A. *Advances in protein chemistry*, 22: 55, 1967.
30. MURTHY, G. K. y R. McL. WHITNEY. *J. Dairy Sci.*, 45: 1, 1958.
31. NORMAN, L., I. G. KAGAN y A. CHORDI. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 13: 816, 1964.
32. PARISH, W. E., A. M. BARRET, R. R. A. COOMBS, M. GUNTHER y F. E. CAMPS. *Lancet*, 2: 1106, 1960.
33. PETERSON, R. D. A. y R. A. GOOD. *Pediatrics*, 31: 209, 1963.
34. POLIS, B. D. y H. W. SHMUKLER. *J. Biol. Chem.*, 201: 475, 1953.
35. RATNER, B., M. DWORETZKY, S. OGURI y L. ASCHHEIM. *Pediatrics*, 22: 449, 1958.
36. ROTHBERG, R. M. y R. S. FARR. *Pediatrics*, 35: 571, 1965.
37. ROULET, D. L. A., M. BEIN y G. VON MURALT. *Milchwissenschaft*, 16: 415, 1961.
38. SANTA MARÍA, P. *Tesis Doctoral*. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra, 1967.
39. SCHEIDEGGER, J. J. *Internat. Arch. Allergy*, 7: 103, 1955.
40. SCHMIDT, D. G. y T. A. J. PAYENS. *Bioch. Biophys. Acta*, 78: 492, 1963.
41. TORMO, J. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria de Madrid, 1966.
42. THOMPSON, M. P., C. A. KIDDY, L. PEPPER y C. A. ZITTLE. *Nature*, 195: 1001, 1962.
43. THOMPSON, M. P. y L. PEPPER. *J. Dairy Sci.*, 45: 794, 1962.
44. THOMPSON, M. P. y L. PEPPER. *J. Dairy Sci.*, 47: 293, 1964.
45. THOMPSON, M. P. y L. PEPPER. *J. Dairy Sci.*, 47: 633, 1964.
46. THOMPSON, M. P., N. P. TARASSUK, R. JENNESS, H. A. LILLEWIK, U. S. ASHWORTH y D. ROSE. *J. Dairy Sci.*, 48: 159, 1965.