

SIMULACIÓN *IN VITRO* DE LA DIGESTIÓN DE GRASAS LÁCTEAS EN PACIENTES SOMETIDOS A TERAPIA DE SUSTITUCIÓN ENZIMÁTICA: INFLUENCIA DE DISTINTOS FACTORES FISIOLÓGICOS.

Carolina Paz Yépez, Ana B Heredia Gutiérrez¹, Ana M Andrés Grau¹

RESUMEN

Los pacientes de Fibrosis Quística sufren insuficiencia pancreática crónica provocando una maldigestión de los alimentos y, por consiguiente la malabsorción de nutrientes, particularmente aquellos de naturaleza lipídica y vitaminas liposolubles. Actualmente, el tratamiento de estos pacientes se lleva a cabo mediante terapias de sustitución enzimática, aunque los resultados clínicos sugieren que las pautas de administración de los suplementos enzimáticos son poco adecuadas, debido a varios factores que afectan directamente a la efectividad de la terapia, como por ejemplo la composición y estructura de la matriz alimentaria. La disfuncionalidad digestiva de estos pacientes se ve principalmente afectada por alteraciones en las secreciones pancreáticas, el pH intestinal y la composición del fluido biliar, por lo que en el presente trabajo se ha diseñado y puesto a punto un método de digestión *in vitro* que simula las condiciones gastrointestinales en los pacientes de Fibrosis Quística. El método propuesto se ha validado mediante ensayos de digestibilidad lipídica de matrices lácteas para determinar la influencia de la matriz, y adicionalmente se ha evaluado la influencia de la relación Enzima:Sustrato en la extensión de la digestibilidad de la leche.

Los resultados obtenidos revelan la influencia de la composición del fluido biliar en la digestión de la grasa. La extensión de la lipólisis obtenida con la fórmula biliar simulada para mimetizar la bilis de los pacientes de fibrosis quística resultaron similares a los obtenidos con la bilis humana simulada y superiores a los obtenidos con bilis porcina. Por otro lado, no se detectaron diferencias entre los distintos productos lácteos analizados por lo que la cantidad de suplemento enzimático adecuada resulta más dependiente de la cantidad y tipo de grasa que de la matriz, al menos en productos lácteos.

PALABRAS CLAVE: Lipólisis, digestión *in vitro*, sustitución enzimática, fibrosis quística, insuficiencia pancreática, ácidos grasos libres.

ABSTRACT

Cystic fibrosis patients have chronic pancreatic insufficiency causing maldigestion of food and therefore malabsorption of nutrients, particularly those of lipid nature and liposoluble vitamins. Currently, treatment of these

¹ Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IU-IAD). Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.

patients is performed using enzyme replacement therapy, although clinical results suggest that dosing schedules of enzyme supplements are unsuitable due to several factors that directly affect the effectiveness of therapy, such as for example the composition and structure of the food matrix. Digestive dysfunction in these patients is mainly affected by changes in pancreatic secretions, intestinal pH, and the composition of the bile fluid. In this paper it has designed and perfected an in vitro digestion method which simulates gastrointestinal conditions in Cystic Fibrosis Patients. The proposed method has been validated by lipid digestibility assays in dairy matrices to determine the influence of the matrix, additionally we evaluated the influence of the enzyme:substrate ratio in extending milk digestibility.

Results obtained reveal the influence of the biliary fluid composition on the extension of lipolysis. With the simulated biliary formula, used for mimicking the composition in Cystic Fibrosis patients, the extension of lipolysis obtained was similar to those obtained with the simulated human bile and higher than the results obtained with the porcine bile. On the other hand, no differences were detected among the analysed dairy products and so, the adequate amount of enzymatic supplement results more dependent on the amount and type of fat than on the food matrix, this being true at list in dairy products.

KEY WORDS:

Lipolysis, in vitro digestion, enzyme replacement, cystic fibrosis, pancreatic insufficiency, free fatty acids.

RESUM

Els pacients de Fibrosi Quística pateixen insuficiència pancreàtica crònica provocant una maldigestió dels aliments i, per consegüent la malabsorció de nutrients, particularment aquells de naturalesa lipídica i vitamines liposolubles. Actualment, el tractament d'aquests pacients es du a terme per mitjà de teràpies de substitució enzimàtica, encara que els resultats clínics suggereixen que les pautes d'administració dels suplementes enzimàtics són poc adequades, a causa de diversos factors que afecten directament l'efectivitat de la teràpia, com per exemple la composició i estructura de la matriu alimentària. La disfuncionalitat digestiva d'aquests pacients es veu principalment afectada per alteracions en les secrecions pancreàtiques, el pH intestinal i la composició del fluid biliar, per la qual cosa en el present treball s'ha dissenyat i posat a punt un mètode de digestió in vitro que simula les condicions gastrointestinals en els pacients de Fibrosi Quística. El mètode proposat s'ha validat per mitjà d'assajos de digestibilitat lipídica de matrius làcties per a determinar la influència de la matriu, i adicionalment s'ha avaluat la influència de la relació enzim:substrat en l'extensió de la digestibilitat de la llet.

Els resultats obtinguts revelen la influència de la composició del fluid biliar en l'extensió de la lipòlisi. Amb la formula biliar simulada per a mimetitzar la bilis



dels pacients amb Fibrosi Quística, es va obtindre una extensió de la lipòlisi similar als resultats obtinguts amb la bilis humana simulada, i superiors als obtinguts amb bilis porcina. D'altra banda, no es van detectar diferències entre els distints productes lactis analitzats així que la quantitat de suplement enzimàtic adequada resulta més dependent de la quantitat i tipus de greix que de la matriu, al menys en productes lactis.

PARAULES CLAU: Lipòlisi, digestió in vitro, substitució enzimàtica, fibrosi quística, insuficiència pancreàtica, àcids grassos lliures.

1. INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética autosómica recesiva que presenta mutaciones en el gen que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana (CFTR). Las manifestaciones fisiopatológicas afectan principalmente a los pulmones, aunque también se originan otras alteraciones negativas en la funcionalidad fisiológica de páncreas e hígado, así como la aparición de procesos de inflamación en el epitelio intestinal. La alteración del CFTR causa una disminución en la secreción de Cl^- , agua y HCO_3^- con la consiguiente deshidratación de las secreciones pancreática y biliar causando la dilatación y la obstrucción de los conductos pancreático y biliar (Li Li et al. 2014).

La alteración de las secreciones pancreática y biliar causa una digestión deficiente de los alimentos y, por consiguiente la malabsorción de nutrientes, particularmente aquellos de naturaleza lipídica y vitaminas liposolubles (Bruno et al., 1995). Actualmente, el tratamiento de la enfermedad se lleva a cabo mediante terapias de sustitución enzimática (TSE), si bien, las mejoras que se producen de la digestibilidad lipídica de los alimentos son insuficientes no solo debido a que cada individuo puede presentar mutaciones particulares del gen CFTR, sino también por la diferente digestibilidad lipídica de los alimentos en función de su naturaleza matricial. Así, en los pacientes adscritos a las TSE siguen presentes las deficiencias en la digestión de alimentos y absorción de nutrientes que no sólo conducen al empeoramiento del estado nutricional y de la función pulmonar, sino que también provocan manifestaciones marginales ocasionando dolor abdominal y esteatorrea y en general empeoramiento de morbilidad y la calidad de vida del paciente de FQ.

La TSE consiste en la administración de suplementos enzimáticos (Kreon[®]) formulados como microencapsulados gastrorresistentes que aportan pancreatina porcina con actividad lipasa, amilasa y proteasa. Actualmente las asociaciones de enfermos de FQ y entidades clínicas han consensuado la dosificación de Kreon[®] en base al contenido graso en la dieta y el peso (kg) corporal llegando a establecerse una dosis máxima de hasta 4000 U/g grasa ingerida (Feiker et al., 2011). Estas pautas de dosificación parecen insuficientes para la eficiencia del tratamiento puesto que factores individuales como el tiempo de vaciado gástrico, condiciones de acidez, tránsito intestinal etc., así como características inherentes a los alimentos como la matriz alimentaria y el tipo de grasa, influyen finalmente en la digestibilidad de las grasas (Borowith et al., 2013; Rovner et al., 2013).

El análisis de sistemas y de procesos alimentarios puede utilizarse como herramienta potencialmente muy útil para la mejora significativa de la TSE. La caracterización de matrices alimentarias no solo en términos de composición sino también de su microestructura y funcionalidad, así como el estudio de las interacciones y la modelización y parametrización de los cambios que sufren los alimentos durante el proceso digestivo pueden utilizarse para el estudio de la digestibilidad lipídica de los alimentos en condiciones fisiológicas típicas de la FQ. Debido a las particularidades fisiológicas de cada individuo, los resultados obtenidos con estas

herramientas deben entenderse únicamente como una etapa previa a los estudios in vivo que permitirán valorar de modo absoluto e individualizado la digestibilidad lipídica en los alimentos. Actualmente se dispone de métodos in vitro que permiten el estudio de los factores implicados en la digestibilidad sin las claras restricciones éticas de los estudios in vivo y en condiciones muy controladas y estandarizadas (Hu et al., 2010; Li et al., 2011; Minekus et al., 2014). En este contexto, los sistemas de valoración automática para monitorizar la liberación de ácidos grasos durante la lipólisis se han mostrado como una metodología rápida y precisa para monitorizar la lipólisis desde los alimentos, aunque se han puesto de manifiesto discrepancias de esta metodología con respecto a técnicas más específicas y complejas como la cromatografía de gases en función, por ejemplo, del surfactante presente en el medio. La mayoría de los trabajos que han utilizado esta técnica se han llevado a cabo con disoluciones y/o emulsiones modelo (Sassenne et al., 2014) y son escasos los estudios de digestión sobre alimentos complejos o matrices alimentarias completas (Bourlieu et al., 2015).

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un método de digestión in vitro que simule las condiciones gastrointestinales en los pacientes de FQ que permita abordar el estudio de la influencia del pH intestinal y de la composición del fluido biliar en la digestibilidad de las grasas procedentes de matrices lácteas, todo ello orientado a establecer la dosis de suplemento necesaria para la adecuada digestión de los correspondientes sustratos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En los estudios llevados a cabo se han utilizado distintas matrices lácteas, leches y yogures, obtenidas de los comercios locales (Valencia, España). Las matrices corresponden a una leche evaporada (A), leche entera (B), Yogurt azucarado (A), y Yogurt natural (B). En la tabla 1 se muestran la composición nutricional según se indica en el etiquetado del producto.

Tabla 1. Información Nutricional en 100 ml obtenida del etiquetado de los productos lácteos empleados en el estudio.

Muestras	Energía (kcal)	Grasa (saturadas) (g)	Proteínas (g)	Carbohidratos (g)	Calcio (mg)
Leche-A	116	6,0 (3,5)	6,3	9,3	229
Leche-B	64	3,6 (2,5)	3,0	4,8	115
Yogurt-A	81	1,9 (1,2)	3,0	12,3	120
Yogurt-B	58	2,9 (1,8)	3,2	4,0	120

El suplemento enzimático empleado para la sustitución de la pancreatina humana fue el Kreon 10000 de Abbott Laboratories, S.A®. Cada cápsula contiene 150 mg de pancreatina porcina en forma de minimicroesferas gastrorresistentes, equivalentes a: 8.000 U. Ph. Eur. de Amilasa, 10.000 U. Ph. Eur. de Lipasa, 600 U. Ph. Eur. de Proteasa.

2.1 Simulación in vitro de la Digestión

El método in vitro utilizado para estudiar la digestibilidad de las grasas lácteas está basado en un protocolo consensuado internacionalmente de simulación del proceso gastrointestinal en tres etapas: oral, gástrica e intestinal (Minekus et al., 2014). Sobre este protocolo se han realizado modificaciones del valor de pH en la etapa intestinal adaptándolo a los valores registrados en estudios in vivo en pacientes de FQ (Youngberg et al., 1987); asimismo se ha modificado la composición y concentración del fluido biliar al objeto de acercar la simulación in vitro a las condiciones fisiológicas de este tipo de pacientes (Aseeri A, et al., 2012). La composición y concentración de los fluidos preparados para la simulación de cada una de las etapas del proceso de digestión se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de los fluidos simulados de digestión. El volumen está calculado para un volumen final de 500ml para cada líquido simulado: salival (FSS), gástrico (FGS) e intestinal (FIS).

Constituyente ¹	Fluidos simulados		
	Salival (FSS)	Gástrico (FGS)	Intestinal (FIS)
	mmol L ⁻¹	mmol L ⁻¹	mmol L ⁻¹
KCl	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	13,6	25	85
NaCl	-	47,2	38,4
MgCl (H ₂ O) ₆	0,15	0,1	0,33
(NH ₄)CO ₃	0,06	0,5	-
HCl	1,1	15,6	8,4
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	1,5	0,15	0,6

¹Para llevar a cabo los estudios de digestibilidad, salvo que se especifique otra indicación, todos los reactivos se obtuvieron de SigmaAldrich.

Para la simulación del proceso digestivo se utilizó el equipo 902 STAT Titrino (Methrom), que incluye software de titulación (Tiamo™ light), un agitador magnético (801 Stirrer) y un vaso analizador conectado a un baño termostático. Este equipo permite automatizar la valoración de reacciones ácido-base. Al vaso de reacción se le acopla en su parte superior un dosificador automático con el valorante (ácido o base) y un electrodo de vidrio que sirve para registrar el pH y la temperatura. El programa de análisis del equipo permite establecer distintos métodos desarrollados a través de un diagrama de flujo, que ilustra cada una de las etapas y cuyos parámetros se ajustan individualmente. Las funciones utilizadas para simular el proceso son medida de pH (“*measure pH*”), ajuste de pH (“*set pH*”) y valoración a pH constante (“*pH-stat*”). Durante el desarrollo de la fase intestinal, bajo condiciones de pH constante, el software del equipo permite el registro de la

curva de consumo de valorante, lo que en el caso de la etapa de digestión intestinal puede relacionarse directamente con la liberación de ácidos grasos libres procedentes de la lipólisis de la grasa.

Alícuotas (20g) de las distintas muestras se mezclaron con 18 ml de FSS al que se adicionaron 2 ml de una disolución de α -amilasa (EC 3.2.1.1, 75 U/ml) preparada en FSS. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 minutos (Figura 1). Posteriormente, se prosiguió con la simulación de la etapa gástrica mediante adición de 35 ml de FGS, 5 ml de una disolución de pepsina (EC 3.4.23.1) (2000 U/ml) preparada en FGS, y la cantidad de Kreon® según el diseño experimental en cada caso. El pH de la mezcla se ajustó a un valor de 3 (con HCl 2N) y la función "stat-pH" se utilizó para mantener estable el valor de pH a lo largo de la incubación (37°C) de la etapa gástrica que duró 30 minutos. El tiempo de incubación de la etapa gástrica, se estableció en base a estudios fisiológicos en los que se establece que la duración de esta etapa depende fundamentalmente del tamaño de partícula del alimento (Armand et al., 2004).

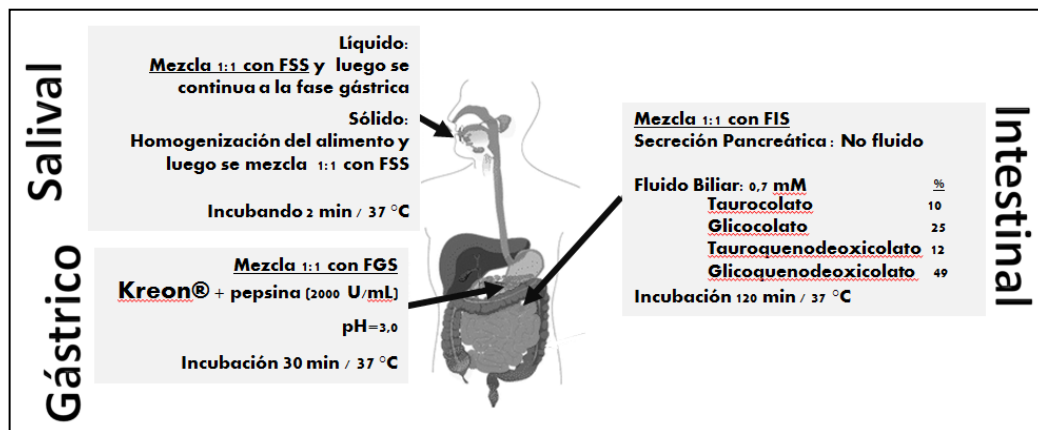


FIGURA 1. Esquema representativo de las distintas etapas de la simulación in vitro del proceso de digestión .

Una vez transcurrido el tiempo correspondiente a la etapa gástrica, al digerido resultante se adicionaron 70 ml de FIS, junto con 10 ml de una disolución de ácidos biliares preparada en FIS conforme a la composición y concentración que se indican en la Tabla 3. La mezcla resultante se ajustó (con HCl 2N) al valor promedio de pH intestinal en pacientes FQ (pH=6). Para simular el progreso gradual de pH en la fase intestinal, observada a nivel fisiológico en pacientes de FQ (Gelfond et al., 2013), la elevación de pH se llevó a cabo en 3 etapas, 7,5 minutos a pH 5 seguidos de 7,5 min a pH 5,5 y 105 minutos a pH 6. El tiempo de duración de la etapa intestinal, así como los valores de pH, se establecieron teniendo en cuenta el tiempo de tránsito (Youngberg et al., 1987) y los cambios de pH (Gelfond et al., 2013) indicados en pacientes de FQ.

2.2 Fluidos biliares

Para el estudio de la influencia de la bilis se trabajó con la matriz Leche A, la cual fue sometida al proceso de digestión antes mencionado, teniendo como única variable en el FIS el uso de distintas composiciones de sales biliares. Las alteraciones en la composición del fluido biliar de los pacientes de FQ se simuló utilizando distintas disoluciones y mezclas de los principales ácidos biliares disponibles comercialmente: taurocolato sódico (TC, T4009), glicocolato sódico (GC, G7132), tauroquenodeoxicolato sódico (TCDC, T6250) y glicoquenodeoxicolato sódico (GCDC, G0759). En la Tabla 3 se muestra la composición de las distintas mezclas biliares preparadas en FIS con una concentración final de 0,7 mM. A todas ellas se adicionó 2ml de bilis porcina con objeto de aportar una pequeña cantidad de fosfolípidos y colesterol sin contribuir significativamente en el contenido de los ácidos biliares formulados (Makie & Rigby, 2015). Como referencia, y debido a su extensa utilización por la comunidad científica en los métodos de digestión in vitro, se ensayó también bilis porcina a dos concentraciones distintas (0,7 y 10 mM) (CAS: 8008-63-7). Asimismo, se simuló la bilis humana formulada a partir de bilis bovina y TCDC a una concentración 10 mM con el fin de simular el nivel de digestibilidad que obtendrían individuos sanos.

TABLA 3. Composición del fluido biliar simulado utilizado en los estudios de digestibilidad.

Mezclas Biliares	Concentración	Ácidos biliares				Bilis Bovina (mg)
		TC(mg)	TCDC (mg)	GC(mg)	GCDC(mg)	
1	0,7 mM	25	--	--	--	-
2	0,7 mM	--	--	25	--	-
3	0,7 mM	35,7	42,9	89,3	178,5	-
4	10 mM	-	-	-	13,2	4,4

2.3 Extensión de la Digestión de la grasa (ED %)

A partir de los volúmenes utilizados en la valoración ácido-base durante la etapa intestinal se calculó el contenido de ácidos grasos libres (AGL) al final de la etapa (120 minutos) y se determinó la extensión de la digestión (ED) de acuerdo a la siguiente expresión (1) (Bourlieu et al., 2015).

$$\%ED = \frac{(AGL)(MMeq)}{CG \times Vx [TAG] \times 3} \quad (1)$$

Donde AGL= representa la concentración de ácidos grasos libres (mmol); MMeq= es la masa molar promedio de los productos de la lipólisis (771 g mol^{-1}) obtenida por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas a partir del análisis de ácidos grasos libres presentes en el digerido; CG= concentración de grasa (g mL^{-1}) en el volumen de reacción; V= volumen de fluidos simulados en el vaso de reacción; [TAG]= contenido promedio de triglicéridos en la leche (98,5%).

2.4 Ensayo de liberación del suplemento enzimático

Para estudiar la cinética de liberación del Kreon® y estimar la actividad lipasa en el medio de liberación durante la etapa intestinal, se pesaron cuatro alícuotas de 51 mg de Kreon®, correspondientes a 30 mg de pancreatina y 2000 U lipasa. El suplemento se sometió a un proceso de digestión equivalente al descrito en el apartado anterior, utilizando los correspondientes fluidos simulados de manera que en la etapa intestinal el volumen final fue de 60 ml. Dado que el suplemento está diseñado para iniciar su liberación en la etapa intestinal, se tomaron alícuotas (0.2 ml) a 0 minutos (t_0), 10 minutos (t_{10}), 20 minutos (t_{20}), 30 minutos (t_{30}), 45 minutos (t_{45}), 60 minutos (t_{60}), 90 minutos (t_{90}) y 120 minutos (t_{120}). De cada alícuota, la mitad se utilizó para el ensayo de actividad enzimática y la otra mitad para la determinación de proteína liberada al medio.

2.5 Ensayo de actividad lipasa de la pancreatina (EC3.1.13)

La determinación de la actividad se llevó a cabo en 14,5 ml de una mezcla de reacción (taurocolato 62,5 mg, CaCl_2 50 mg, TAME 10 mg disueltos en 250 ml de NaCl 0,9% p/v) a la que se adiciona 0,5 ml de tributirina (97%). Todas las disoluciones empleadas se prepararon en el momento previo al análisis y se filtraron (Whatman nº 1) antes de su uso, la actividad de la lipasa pancreática se calculó en unidades internacionales (UI) considerando $1\text{U} = 1 \mu\text{mol}$ ácido butírico liberado por minuto a 37°C . La actividad lipasa se determinó a pH 6 (condiciones fisiológicas en las que debe actuar el suplemento). El suplemento de sustitución enzimática aporta ~39,2 Unidades de actividad lipasa por mg de sólido (equivalente a 66,67 Unidades de actividad lipasa por mg de pancreatina).

2.6 Determinación de proteína liberada al medio

La cantidad de proteína liberada al medio se determinó por el método de Bradford (1976), que cuantifica la unión del colorante Azul de Coomassie a una proteína desconocida y se compara con una curva estándar de diferentes concentraciones de la proteína de albúmina de suero de bovino (BSA).

2.7 Análisis estadístico

Se utilizó el programa Statgraphics. Las diferencias se establecieron mediante el test "t" de Student. Mediante análisis de la varianza (one-way) se comparó el efecto del peso de muestra en el grado de digestión. En el caso que las medias resultasen significativas se llevó a cabo un test de Tukey múltiple estableciéndose un nivel de probabilidad del 95%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los pacientes con FQ presentan disfuncionalidades orgánicas que alteran de modo significativo los parámetros fisiológicos en el medio gastrointestinal y afectan la digestibilidad de los alimentos (Li et al., 2014). La disfuncionalidad digestiva se ve principalmente afectada por alteraciones en el pH intestinal y en la composición del fluido biliar, por lo que la dosificación del suplemento enzimático de pancreatina adecuado a cada matriz alimentaria deberá estimarse teniendo en cuenta también la alteración de estos factores.

3.1 Liberación del suplemento enzimático en condiciones de pH intestinal que simulan la fisiología de pacientes FQ

El ajuste gradual del pH llevado a cabo durante la etapa intestinal en el método de digestión in vitro, simula la lenta transición del pH gástrico al pH intestinal observado en pacientes de FQ hasta alcanzar un valor de pH=6 (Youngberg et al., 1987). El progreso de la enfermedad conlleva la obstrucción de los conductos pancreáticos y biliar, lo que provoca en estos pacientes unas condiciones fisiológicas a nivel intestinal que se caracteriza por un valor de pH=5,5 postprandial después de 15 minutos del alimento en el intestino y de pH=6 al cabo de 35 minutos (Armand et al., 2004; Gelfond et al., 2013). El ensayo realizado en este trabajo está orientado a determinar la cinética de liberación del suplemento en condiciones de pH intestinal simuladas de acuerdo a la fisiología de pacientes FQ, cuantificando no solo la proteína liberada al medio sino también la actividad lipasa de la misma.

En la Figura 2 se muestra la cinética de liberación de proteína al medio intestinal (A), la evolución de la actividad Lipasa en el medio intestinal (B) y la evolución de la actividad lipasa específica en el medio durante la etapa intestinal. Se observa (Figura 2A) que en las condiciones de evolución gradual del pH en la fase intestinal, la liberación completa de la proteína del suplemento se consigue a los 30 minutos coherentemente con las especificaciones del fabricante. Sin embargo, los resultados de actividad lipasa en el medio indican que en ningún momento de la digestión se alcanza el máximo teórico de actividad lipasa (33,3 Unidades de lipasa/ml). Estos resultados confirman la inestabilidad de la lipasa pancreática apuntada por otros autores y que se refleja claramente al representar la evolución de la actividad específica (Figura 2C). Por tanto, en las condiciones simuladas observamos una liberación eficiente (30 minutos) seguida de una degradación y/o inactivación parcial de la lipasa pancreática. La actividad lipasa específica (unidades/mg) correspondiente al máximo teórico (66,67 U Lipasa/mg) únicamente se alcanza en los primeros minutos tras la liberación, descendiendo progresivamente hasta un valor de actividad específica residual en torno a 35 U Lipasa /mg.

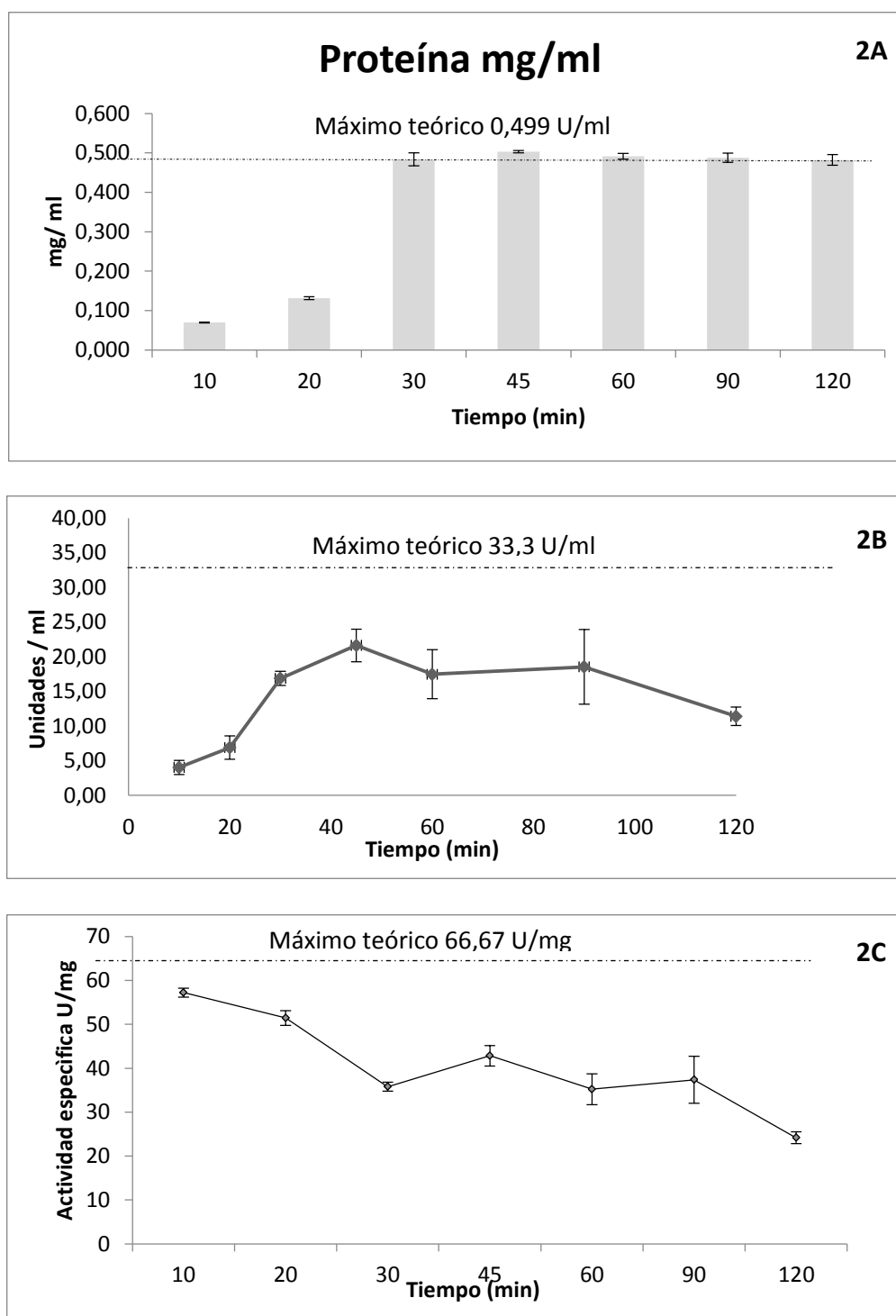


Figura 2. (A) Cinética de liberación de proteína al medio intestinal, (B) la evolución de la actividad Lipasa en el medio intestinal, Evolución de la actividad específica (C).

3.2. Efecto de la composición del fluido biliar en la lipólisis.

La composición del fluido biliar simulado (mezcla 3 Tabla 3) utilizado en los estudios de digestibilidad se estableció en base a la composición

descrita en aspirados gastroesofágicos de pacientes de FQ (Aseeri, et al., 2012). En este estudio se observó una concentración 3,8 veces mayor de ácidos biliares glicoconjugados que de tauroconjugados, a la vez que compuestos como el ácido glicodeoxicólico presenta concentraciones 2,1 veces superior al ácido glicocólico. Además, datos obtenidos con modelos experimentales (ratones C57Bl/6 *Cftr*^{-/- tm1^{CAM}}) también avalan las marcadas diferencias en la concentración de los isómeros glicolato y glicodeoxicolato en la patogénesis de la FQ (Bodewes et al., 2012). Ambos estudios presentan aspectos concordantes que sugieren un importante papel de los glicoconjugados deoxicolato y quenodeoxicolato en la fibrosis quística.

En la Figura 3 se muestran los resultados de la extensión de la lipólisis en la leche A en función de la concentración y composición del fluido biliar. El método armonizado para los procesos de digestión establece una concentración de fluido biliar de 10 mM (Minekus et al., 2014). En el presente trabajo se decidió utilizar una concentración de 0,7 mM basada en los bajos contenidos de fluido biliar que presentan los pacientes de FQ en aspirados gastroesofágicos (Asseri et al. 2014). En cuanto a la composición cabe señalar que son numerosos los estudios científicos que emplean bilis porcina en la etapa intestinal de digestión, si bien, la composición de la misma no es de características similares a la humana (Makie & Rigby, 2015); por este motivo se evalúa en este trabajo la influencia tanto de la concentración como de la composición del fluido biliar. El análisis estadístico de los resultados no reflejan diferencias significativas en la extensión de la digestión de la grasa (ED%) como consecuencia de la diferencia de concentración de la bilis porcina, y éstas a su vez, tampoco se diferencian de las mezclas preparadas exclusivamente con ácidos biliares primarios; si bien la ED de los ensayos sin bilis fue menor que la obtenida en presencia de bilis, las diferencias con respecto a estas mezclas no son significativas a juzgar por los grupos homogéneos que identifica el análisis estadístico. Sin embargo, la ED obtenida con la bilis humana simulada tanto para individuos sanos como para pacientes FQ fue mayor que en el resto de mezclas y no resultó diferente entre ellas. Estos resultados son coherentes con la diferente composición de la bilis porcina con un contenido de glicoquenodeoxicolato 13 veces superior al de tauroquenodeoxicolato (Makie & Rigby, 2015), lo que ejerce una marcada influencia en la capacidad micelar del medio que finalmente condiciona la lipólisis. Los derivados tauroconjugados forman micelas de menor tamaño, de ahí que se consiga una mayor digestibilidad de las grasas cuando se simula la composición de la bilis humana, e incluso cuando se simula la bilis de un paciente FQ.

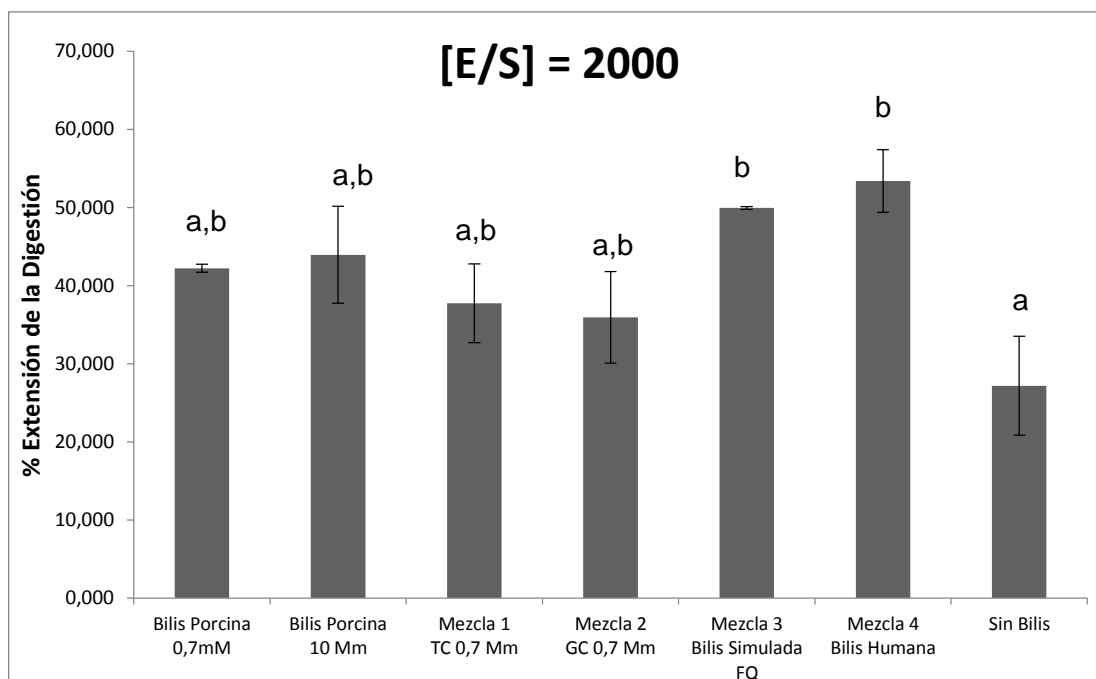


FIGURA 3 Efecto de las fórmulas biliares en la extensión de la digestión evaluadas en Leche A. Las letras a, b indican los grupos homogéneos identificados en el análisis estadístico.

3.3 Efecto de la relación Enzima/ Sustrato en la digestibilidad de la grasa de leche

La Figura 4 muestra los resultados de extensión de la digestión lipídica de la Leche A utilizando distintas relaciones enzima:sustrato (E/S). El análisis estadístico no detecta diferencias significativas en la ED de los tres ratios ensayados; sin embargo, en un trabajo previo en el que se ensayaron relaciones E/S en un intervalo de 350 a 4200 unidades de lipasa por gramos de grasa, se observó un incremento de la extensión de la lipólisis conforme aumenta este ratio (Calvo et al., 2014), y los valores obtenidos son coherentes con los obtenidos en este trabajo con los ratios de 2000 y 4000 UL/g; analizándose conjuntamente los resultados de ambos trabajos podría deducirse que existe un valor máximo a partir del cual un aumento de la cantidad de enzima en el medio no mejora la extensión de la digestión de la grasa láctea, e incluso podría ir en detrimento de la reacción lipolítica debido a fenómenos de agregación. Dado el carácter hidrofóbico de la zona de contacto lipídico cercana al centro activo de las lipasas pancreáticas, no es descartable su interacción con otras sustancias de su misma naturaleza presentes en el medio, incluyendo las zonas hidrofóbicas de otras moléculas de enzima. Estas interacciones pueden conducir a la formación de agregados (Snellman et al., 2002) con baja o ninguna actividad catalítica, debido al bloqueo de los centros activos por las propias moléculas enzimáticas. El fenómeno de agregación en soluciones acuosas ha sido demostrado experimentalmente por varios grupos de investigadores (Flaschel y Renken, 1991; Guisán et al., 1996; Palomo et al., 2003), los que obtuvieron un rápido descenso de la actividad enzimática al aumentar la

concentraci3n de enzima (Pedersen et al., 2006). Adicionalmente, se observa que la desviaci3n estándar de la ED aumenta conforme aumenta la E/S en la vasija de reacci3n, lo que también podría estar relacionado con este tipo de fen3menos.

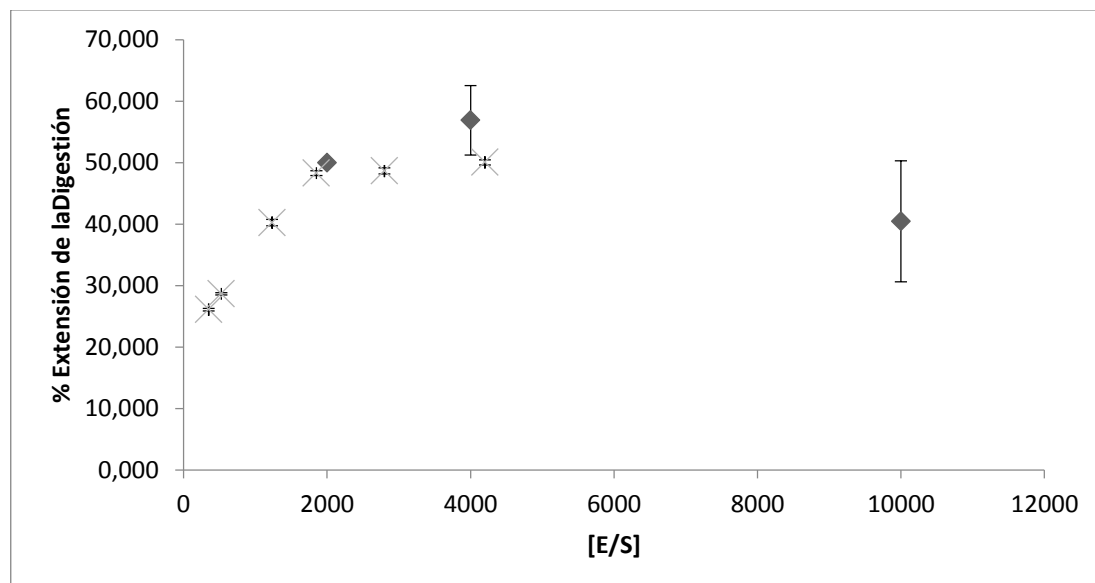


FIGURA 4. Efecto de la relaci3n enzima/sustrato ($[E]/[S]$) en el grado de digestibilidad de Leche A. (X= Valores obtenidos por Calvo et al. 2014)

3.4 Comparaci3n de la digestibilidad de la grasa en distintas matrices lácteas.

La Figura 5 muestra los resultados de extensi3n de la lip3lisis obtenidos tras la digesti3n in vitro de distintas matrices lácteas utilizando el fluido biliar que simula las condiciones intestinales de un paciente FQ y una relaci3n enzima:sustrato de 2000 Unidades de Lipasa por gramo de grasa. El análisis estadístico tampoco detecta diferencias entre los distintos productos lácteos analizados a pesar de las diferencias tanto en composici3n como estructura, por lo que podría intuirse que es la naturaleza de la grasa en si misma el factor más influyente en la extensi3n de la digesti3n. No obstante, este supuesto deberá confirmarse mediante ms digestiones in vitro en los que se ensayen diferentes ratios enzima:sustrato en los diferentes productos lácteos.

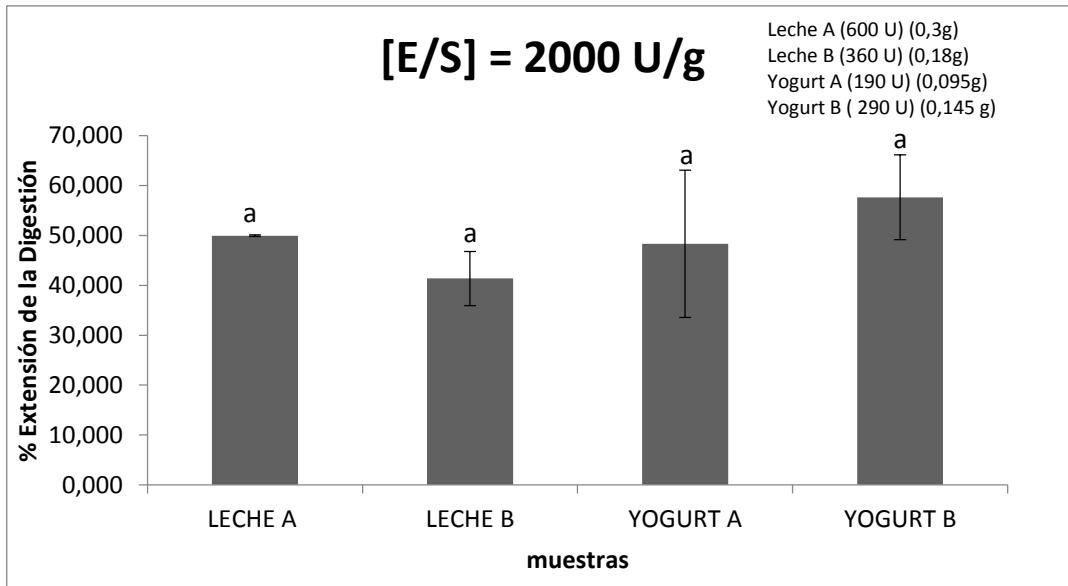


FIGURA 5. Extensión de la digestión en matrices lácteas. Las letras a, b indican los grupos homogéneos identificados en el análisis estadístico.

4. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

La composición del fluido biliar influencia significativamente la extensión de la digestión, por lo que en los métodos de digestión in vitro de alimentos reales se recomienda utilizar fluidos biliares de composición similar a la bilis humana, como por ejemplo bilis de origen bovino (Makie & Rigby, 2015).

La relación entre la concentración de enzima y de sustrato resulta crítica en el grado de digestibilidad de las grasas en el alimento, no solo por su influencia en la extensión de la digestión sino también por los fenómenos de agregación asociados a la presencia de cantidades de enzima en el medio.

El método de digestión evaluado contempla los principales factores de relevancia fisiológica en pacientes de fibrosis quística para estudiar la digestibilidad de grasas lácteas, ajustando gradualmente el pH en la etapa intestinal desde un valor de 5 a 6 y valorando la extensión de la digestibilidad mediante la técnica de pH-Stat. A pesar de que éste es un método ampliamente utilizado en estudios de digestibilidad, llama la atención que los valores de ED obtenidos no supera en ningún caso el 60%, lo que podría estar relacionado con el valor de pH al que se ha medido la liberación de ácidos grasos libres (AGL). Dado que la valoración de AGL se ha llevado a cabo paralelamente a la digestión (pH=6) podrían encontrarse en el medio productos de la lipólisis con un pK superior, que por no encontrarse ionizados no pueden ser valorados al pH de la digestión intestinal (Beisson et al., 2000). Debería por tanto comprobarse en futuros trabajos la presencia de AGL no ionizados interrumpiendo la digestión a distintos tiempos y procediendo a la cuantificación de estos productos de la lipólisis mediante valoración a pH=9.

Finalmente y como recomendación adicional para futuros trabajos, y en base al incremento de la desviación estándar observados en la comparación de las distintas matrices lácteas, resulta imprescindible adaptar la concentración del valorante a la velocidad de la lipólisis. La correlación encontrada entre la raíz cuadrada de las desviaciones estándar con las Unidades de Lipasa presentes en el medio (Figura 6) ilustran la necesidad de adaptar la velocidad de neutralización de los AGL seleccionando adecuadamente la molaridad de la base utilizada para mantener constante el pH en la fase intestinal.

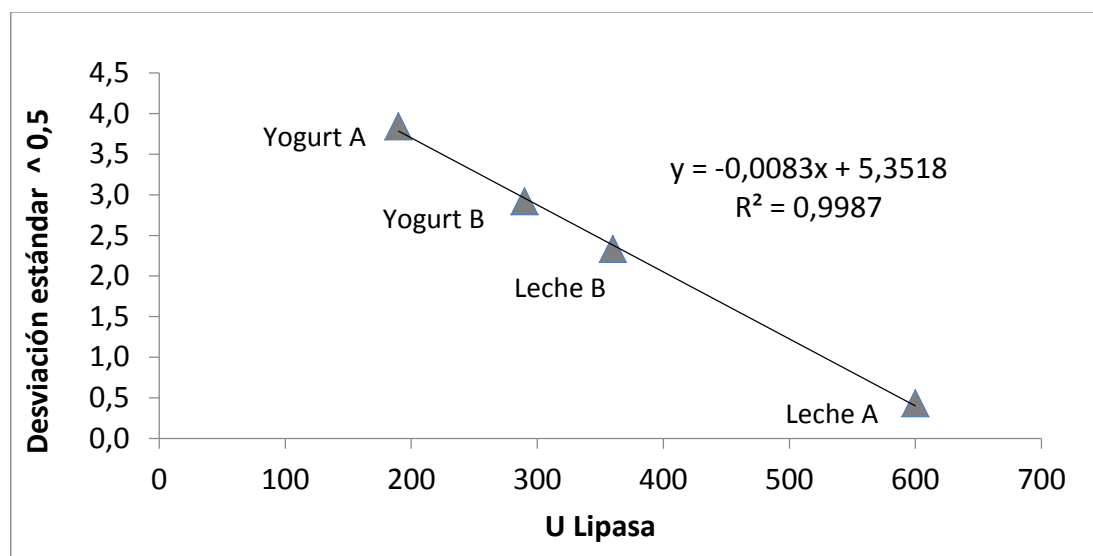


FIGURA 6. Correlació entre la raiz cuadrada de las desviaciones estándar con las Unidades de Lipasa en las matrices lácteas.

5. REFERENCIAS

- Armand M, Hamosh M, Philpott JR, Resnik AK, Rosenstein BJ, Hamosh A, Perman JA, Hamosh P. Gastric function in children with cystic fibrosis: effect of diet on gastric lipase levels and fat digestion. *Pediatr Res.* 2004, 55(3):457-65.
- Aseeri A, Brodlië M, Lordan J, Corris P, Pearson J, Ward C, Manning N. Bile acids are present in the lower airways of people with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012, 185(4):463.
- Bodewes FA, Wouthuyzen-Bakker M, Bijvelds MJ, Havinga R, de Jonge HR, Verkade HJ. Ursodeoxycholate modulates bile flow and bile salt pool independently from the cystic fibrosis transmembrane regulator (Cftr) in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012, 302(9):G1035-42.
- Borowitz, D.; Gelfond, D.; Maguiness, K.; Heubi, J.B.; Ramsey, B. 2013. Maximal daily dose of pancreatic enzyme replacement therapy in infants with cystic fibrosis: a reconsideration. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12(6): 784-785.
- Bourlieu C, Ménard O, De La Chevasnerie A, Sams L, Rousseau F, Madec MN, Robert B, Deglaire A, Pezennec S, Bouhallab S, Carrière F, Dupont D. The structure of infant formulas impacts their lipolysis, proteolysis and disintegration during in vitro gastric digestion. *Food Chem.* 2015, 182:224-35.
- Bruno, M.J.; Haverkort, E.B.; Tytgat, G.N.; van Leeuwen, D.J. 1995. Maldigestion associated with exocrine pancreatic insufficiency: implications of gastrointestinal physiology and properties of enzyme preparations for a cause-related and patient – tailored treatment. *The American Journal of Gastroenterology*, 90(9): 1383-1393

- Calvo Lerma, J., Heredia, A.; Andrés, A. 2014 Digestión in vitro de grasas en pacientes sometidos a terapia de sustitución enzimática: puesta a punto del método y ensayos de digestión de leche. Tesis Fin de Master. Master Universitario en Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Universitat Politècnica de València.
- Fieker, A.; Philpott, J. and Armand, M. 2011. Enzyme replacement therapy for pancreatic insufficiency: present and future. *Journal of Clinical and Experimental Gastroenterology*, 4: 55-73.
- Flaschel, E., Renken, A. 1991. The behaviour of the *Candida rugosa* lipase in the presence of soluble substrates. En: Alberghina, L., Schmid, R. D. Verger, R. 1991. *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*. Weinheim: GBF Monographs, VCH. 16: 349-52.
- Gelfond D, Ma C, Semler J, Borowitz D. Intestinal pH and gastrointestinal transit profiles in cystic fibrosis patients measured by wireless motility capsule. *Dig Dis Sci*. 2013, 58(8):2275-81.
- Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R., Bastida, A., Blanco, R. M., Soler, G., García-Junceda, E. 1996b. Modulation of activity/stability properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent immobilization on glyoxyl-supports. En: *Malcata F.X. 1996. Engineering of / with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 243-56.
- Hu, M.; Li, Y.; Decker, E.A.; McClements, D.J. 2010. Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model. *Food Hydrocolloids*, 24: 719-725.
- Li Li , Shawn Somerset. Digestive system dysfunction in cystic fibrosis: challenges for nutrition therapy. Review Article in *digestive and liver Disease*. 2014 p. 865-874.
- Li, Y.; Hu, M. and McClements, D.J. 2011. Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method. *Food Chemistry*, 126: 498–505.
- Mackie Alan and Neil Rigby , 2015 , InfoGest Consensus Method, En: Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland , Tor Lea , Teresa Requena, Dominika Swiatecka, Harry Wichers (eds) *The Impact of Food Bioactives on Health, In Vitro and Ex Vivo Models*.Springer Open. 34.
- Minekus, M. Almingier, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carrière, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D. J. McClements, O. M'énard, I. Recio, C. N. Santos, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies and A. Brodkorb. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus.
- Palomo, J. M., Fuentes, M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R. 2003. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* 4 (1): 1-6.
- Pedersen, S., Nesgaard, L., Baptista, R. P., Melo, E. P., Kristensen, S. R., Otzen, D. E. 2006. pH-dependent aggregation of cutinase is efficiently suppressed by 1,8-ANS. *Biopolymers* 83 (6): 619-29.
- Rovner, A.J.; Alisha, J.; Schall, J.I.; Mondick, J.T.; Zhuang, H.; Mascarenhas, M.R. 2013. Delayed small bowel transit in children with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 57(1): 81-84.
- Sassene P, Kleberg K, Williams HD, Bakala-N'Goma JC, Carrière F, Calderone M, Jannin V, Igonin A, Partheil A, Marchaud D, Jule E, Vertommen J, Maio M, Blundell R, Benameur H, Porter CJH, Pouton CW, Müllertz A. 2014 Toward the Establishment of Standardized In Vitro Tests for Lipid-Based Formulations, Part 6: Effects of Varying Pancreatin and Calcium Levels.
- Snellman, E. A., Sullivan, E. R., Colwell, R. R. 2002. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Eur J Biochem* 269: 5771-9.
- Youngberg CA, Berardi RR. Comparison of gastrointestinal pH in cystic fibrosis and healthy subjects. *Dig Dis Sci*. 1987;32:472–480