

HOJA DE APROBACION DE TESIS

Efectos en la Microbiota Intestinal de Infantes Durante el Consumo de Fórmula con Probióticos en el Período de Alimentación Complementaria

Gabriela Naranjo Albuja.

Manuel E. Baldeón, MD., Ph.D.
Director de la Maestría en Alimentos y
Nutrición y
Director de Tesis



.....

Stalin Santacruz, Ph.D.
Miembro del Comité del Tesis



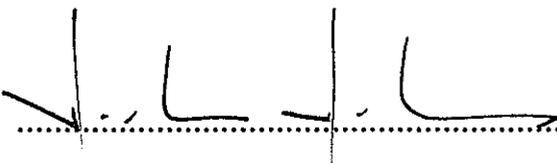
.....

Michael Koziol, Ph.D.
Decano del Colegio de Agricultura,
Alimentos y Nutrición



.....

Víctor Viteri Breedy, Ph.D.
Decano del Colegio de Postgrados



.....

Quito, 28 de febrero del año 2007

© Derechos de Autor
Gabriela Naranjo Albuja
2007

Agradecimientos

Mis sinceros agradecimientos a quienes hicieron posible la realización de este documento. Todos quienes de una u otra manera han aportado a la elaboración del contenido: profesores, compañeros de la institución FNI, familiares y amigos.

En especial a los participantes del estudio: madres, niños y niñas; la compañía Nestlé, la Fundación Niñez Internacional Quito, y la Universidad de Illinois. Un agradecimiento especial a Gabriel Trueba, profesor de la Universidad San Francisco de Quito por sus observaciones en la revisión de la tesis.

Gracias a todos, por sus aportes importantes para el desarrollo de la tesis.

Resumen

Es un estudio clínico con infantes de 6 y 7 meses de edad, 15 niños y niñas divididos en tres grupos. Seleccionados bajo criterios de inclusión específicos, como alimentación con seno materno exclusivo, y similitud de las condiciones socioeconómicas de sus familias.

El primer grupo recibió leche materna, alimentos complementarios y una fórmula infantil con probióticos (*Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus*), el segundo grupo leche materna, alimentos complementarios y una fórmula infantil sin probióticos y el tercer grupo recibió leche materna y alimentos complementarios.

El seguimiento duró 7 meses, tiempo en el cual los grupos fueron monitoreados se registró datos antropométricos y desarrollo psicomotor, además se registró los episodios de infecciones respiratorias y digestivas, se tomó en cuenta la intensidad y la frecuencia de los mismos y paralelamente se analizó la composición bacteriana en muestras de heces de los infantes una inicial, la segunda después de un mes y la tercera a los seis meses del consumo de leche materna, fórmulas y alimentos.

Mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de polimerasa) y DGGE (Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización) se comparó las especies bacterianas entre grupos y se identificó las bandas según la secuencia genética correspondiente a diferentes bacterias.

No se encontró diferencias significativas en los datos antropométricos entre grupos, ni en la frecuencia de infecciones entre los tres grupos, sin embargo todos los grupos experimentaron aplanamiento del patrón en las curvas de crecimiento.

Las especies bacterianas identificadas en las heces entre grupos fueron diferentes, no hubo enriquecimiento con *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* del contenido intestinal en el grupo que recibió probióticos (grupo 1). En el grupo 3, que recibió comida regular (alimentos complementarios) predominó *Bifidobacterium sph 12*, mientras que en los grupos 1 y 2 aquellos quienes recibieron fórmulas se identificó *Bifidobacterium longum bv infantis* y *Bifidobacterium* (no cultivado).

Del análisis microbiológico de la fórmula con probióticos se aisló *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus*.

Palabras claves: Microbiota, Probióticos, Alimentos Regulares o Complementarios, Inmunidad Intestinal.

Abstract

A clinical study has carried out on 6 and 7 months old children, 15 boys and girls divided into 3 groups. The subjects were selected using specific criteria, the most important being that they had been fed exclusively on breast milk and that they were from families with similar socioeconomic backgrounds.

The first group received an infant milk formula with added probiotics such as *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* as well as solid food. The second group received a probiotic- free infant milk formula on top of their solid food. The third group received only solid food without probiotics.

The study lasted 7 months, during which time the groups were monitored using anthropometric figures and neuromotor development data. Episodes of respiratory and digestive tract infections were also registered taking into account their intensity and frequency. In parallel the bacterial composition was analyzed of stool samples taken before the study, after one month and after six months of the consumption of the formulas and food.

Using PCR (polymerase chain reaction) and DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) technology the bacterial species in the different samples were compared and the bands showing genetic sequences corresponding to different bacteria were identified.

No significant differences were found in the anthropometric figures amongst the groups, nor in the incidence of infections in the three groups. However all 3 groups demonstrated reduced growth in relation to the standard growth curves with respect to age.

The bacterial species identified in the stool samples differed amongst the groups.

Those that received probiotics (group 1) did not show enrichment of the intestinal content with *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* In group 3 which only received normal food, *Bifidobacterium sph 12* was predominant while *Bifidobacterium longum by infants* and *Bifidobacterium* (non-cultivated) were identified in groups 1 and 2, which received infant formula.

Microbiological analysis of the formula with probiotics led to the isolation of *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus*.

Key words: Microbiota, Probiotics, Solid foods, Intestinal immune system.

Tabla de Contenido

Capítulo 1

Generalidades	Página
1.1 Introducción	1
1.2 Planteamiento del problema	4
1.3 Justificación	6
1.4 Objetivos	7
1.5 Hipótesis.	

Capítulo 2

Marco Teórico.

1. Fisiología del crecimiento y desarrollo infantil	8
2. Proceso de maduración del intestino	9
3. Leche materna y Alimentación Complementaria	12
4. Microbiota	20
5. Fisiología de la microbiota asociada a la inmunidad	28
6. Probióticos y Suplementación	32

Capítulo 3

Metodología

1. Variables	41
2. Diseño del estudio	43
3. Comité de Etica	43
4. Sujetos	43
5. Suplementación	44
6. Seguimientoclínico:	
Evaluación nutricional, desarrollo psicomotor y registro de infecciones	45
7. Recolección de las muestras de heces	45
8. Análisis microbiológico de la fórmula con prebióticos	45
9. Aislamiento del DNA	46

10. Técnica de la Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	46
11. Determinación de DGGE (Electroforesis por desnaturalización en gel en gradiente)	47

Capítulo 4

Análisis de Datos

1. Resultados del estado nutricional y desarrollo psicomotor	49
2. Resultados de la frecuencia de las infecciones agudas	52
3. Resultado del análisis microbiológico de la fórmula con prebióticos	53
4. Resultados de la composición de la microbiota en heces por PCR y DGGE.	56
5. Resultados de las bandas en gel	62

Capítulo 5

Conclusiones y Recomendaciones

1. Discusión y Conclusiones	64
2. Recomendaciones	66
3. Bibliografía	67
4. Anexos	68

Lista de figuras, cuadros y tablas

1. Figuras

- Figura 1: Sucesión de la microbiota con la edad
- Figura 2: Esquema del desarrollo del ecosistema intestinal humano
- Figura 3: Sistema inmune y microbiota
- Figura 4: Consumo de probióticos: beneficios para la salud
- Figura 5: Balance entre microbiota - probióticos y enterobacterias.
- Figura 6: Principio de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE).
- Figura 7: Curva de seguimiento de peso niños y niñas del estudio
- Figura 8: Curva de seguimiento de longitud niños y niñas del estudio
- Figura 9: Curva de seguimiento de perímetro cefálico niños y niñas del estudio
- Figura 10a y 10b: Morfología de estreptococo y bifidobacteria (fotos)
- Figura 11: Productos de PCR de la región 16sDNA V3 de las bacterias aisladas de la fórmula con probióticos, comparados con productos de diferentes especies bacterianas.
- Figura 12: Productos de PCR de la región 16sDNA V3 de las bacterias aisladas de la fórmula con probióticos.
- Figura 13: Productos de PCR de la región 16sDNA V3 sin amplificar de los tres grupos.
- Figura 14: Productos amplificados por DGGE al primer mes y al sexto mes en el grupo 1, 2 y 3
- Figura 15: Productos amplificados por DGGE al primer mes y al sexto mes en el grupo 1, 2 y 3
- Figura 16: Productos amplificados por DGGE al primer mes y al sexto mes en el grupo 1, 2 y 3
- Figura 17: Dendrograma: correlación de bandas encontradas entre dietas por PCR-DGGE

2. Cuadros

- Cuadro 1: Requerimientos de nutrientes en la infancia
- Cuadro 2: Guía y Recomendaciones en alimentación complementaria
- Cuadro 3: Referencia en la dieta de la ingesta 2002
- Cuadro 4: Frecuencia de infecciones respiratorias agudas (IRA) y enfermedad diarreica aguda (EDA) en la infancia
- Cuadro 5: Factores que se relacionan entre malnutrición e infecciones en infantes
- Cuadro 6: Microbiota gastrointestinal del humano
- Cuadro 7: Técnicas e instrumentos en antropometría
- Cuadro 8: Definición de la intensidad de las infecciones respiratorias agudas y enfermedades diarreicas agudas

3. Tablas.

- Tabla 1: Características generales de los niños y duración de la suplementación.
- Tabla 2: Datos de crecimiento para todos los niños del estudio.
- Tabla 3: Episodios de Diarreas agudas e infecciones respiratorias agudas de todos los grupos participantes.
- Tabla 4: Productos de PCR amplificados de PCR por DGGE. Bandas identificads para cada tratamiento dietético.
- Tabla 5: Identificación de las bandas obtenidas del análisis PCR- DGGE según la secuencia de nucleótidos.

4. Anexos.

- Anexo 1: Información nutricional de las fórmulas
- Anexo 2: Curvas de crecimiento infantil
- Anexo 3: Test Denver
- Anexo 4: Puntajes z de los datos antropométricos de los niños y niñas del estudio.

Capítulo 1

Generalidades

1.1 Introducción

El estudio de los probióticos y su efecto inmunomodulador a nivel intestinal está siendo investigado cada vez más. Se han descrito las funciones innatas de la microbiota intestinal humana que a medida que se establece va modificando el desarrollo de la inmunidad intestinal (10). En ausencia de microbiota, cambian las funciones normales del tejido linfoideo del intestino. La mayor parte de las células que forman este complejo equipo de defensa difieren en tamaño y funcionalidad en ausencia de microbiota. En modelos experimentales con animales libres de gérmenes hay atrofia y poco desarrollo del sistema inmune en contraste con los animales colonizados por un tipo específico bacteriano que se caracterizan por un adecuado desarrollo de la inmunidad (12).

Se practica el uso de probióticos para lograr un efecto beneficioso en el huésped; se reportan resultados clínicos a favor del uso de los mismos, sin embargo es complicado demostrar la colonización del intestino humano con las bacterias vivas suplementadas. Esta investigación tiene por objeto la demostración del efecto del consumo de probióticos en la microbiota de infantes durante el período de alimentación complementaria.

La microbiota normal incluye aproximadamente 400 especies de bacterias, muchas de las cuales son difíciles de cultivar *in vitro* (10). Solo en los últimos años, algunos métodos moleculares han sido descritos para el análisis de la microbiota (18) Esas investigaciones estudian el 16S rDNA y la secuencia de nucleótidos como marcadores individuales para cada componente de la microbiota. Se puede diseñar “primers” (iniciadores) específicos para PCR basados en la región variable de esta molécula para diferenciar bacterias en su género o en su especie, dentro de un complejo ecosistema microbiano. Una vía alternativa para estudiar la secuencia 16S rDNA microbiano heterogéneo es usar PCR “primers” universales para amplificar un fragmento de la secuencia bacteriana en mención por PCR y luego separar esos productos en una secuencia específica por DGGE (1).

El método DGGE separa los productos del PCR de tamaño similar pero de secuencias diferentes por desnaturalización química. En teoría cada banda dentro del perfil del DGGE representa un grupo de organismos relacionados entre sí, y si la especificidad de los “primers” es suficientemente elevada, cada banda puede representar una especie o un aislado bacteriano individual (20).

Esta técnica ha sido usada para monitorear la microbiota intestinal en respuesta a tratamientos con dietas (14). La disponibilidad actual de esta tecnología permite la medición del impacto de los probióticos en la composición de la microbiota. La limitada información respecto al efecto de los probióticos en la composición de la microbiota intestinal y particularmente la reducida información sobre el uso de fórmulas con probióticos en infantes durante el período de alimentación complementaria justifica este tipo de estudios.

La sucesión bacteriana en infantes deriva de las condiciones del parto, de la alimentación exclusiva con leche materna y del inicio de los alimentos sólidos. Se quiere demostrar el enriquecimiento de la microbiota intestinal de infantes con probióticos como *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* usando como vehículo una fórmula infantil de uso comercial.

Se analizó la composición bacteriana de la fórmula comprobándose la presencia de los probióticos mencionados y se identificó las bacterias presentes en la microbiota de las muestras de heces de los infantes con técnicas de biología molecular como aislamiento del DNA, amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) y desnaturalización de las secuencias de DNA para identificación posterior de los diferentes grupos bacterianos.

Se evaluó el crecimiento y el desarrollo, además de la frecuencia de episodios infecciosos respiratorios y digestivos; se comparó entre grupos los datos antropométricos obtenidos y el número de infecciones. Se consideró el registro de las enfermedades respiratorias y digestivas por ser esta edad (desde los 6 meses hasta los 12 meses) la más susceptible ante estos problemas de salud debido a la transición de leche materna a alimentos complementarios y la influencia de las condiciones higiénico sanitarias ante el apareamiento de procesos infecciosos. Las enfermedades infecciosas agudas respiratorias y gastrointestinales son causa importante de desnutrición global y crónica en niños menores de cinco años (30).

Durante la última década se investiga la intervención en la modulación del sistema inmune a través de la administración profiláctica y terapéutica de bacterias vivas bioseguras los probióticos, los cuales podrían prevenir ciertas infecciones como las causadas por *rotavirus*, *Campylobacter jejuni* (2)

Las bacterias ácido lácticas son las que se prefieren para este tipo de estudios (45). *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* son ejemplos de ellas. Estas deben

sobrevivir las barreras fisicoquímicas del tracto digestivo superior, adherirse y colonizar el intestino para interactuar con el epitelio intestinal y el sistema inmune intestinal (2).

Bifidobacterium lactis tiene estas características mencionadas y se conoce de la producción por parte de la bacteria de una sustancia denominada serpina, la cual posiblemente tiene actividad inmunomoduladora (3). En tanto *Streptococcus thermophilus* es una bacteria productora de lactasa, enzima que facilita la digestión de lactosa y disminuye los síntomas de malabsorción, que acompañan a las infecciones gastrointestinales (3).

Los tipos de bacterias que se encuentran en el intestino cambian y evolucionan según la edad del individuo y la alimentación que reciba. La ingesta de probióticos proporciona bacterias vivas de manera temporal, es decir mientras se ingiera el producto. No está determinada la concentración de unidades formadoras de colonias (ufc) de bacterias que permanecen en el intestino necesarias para lograr los beneficios que se le atribuyen a los probióticos, sin embargo hay interés en la medición de las mismas a través de métodos y técnicas de biología molecular como PCR-DGGE aplicado a muestras de heces humanas, basada en la secuencia ribosomal (4).

En la mayoría de los estudios se ha medido los cambios clínicos que presentan los pacientes al recibir probióticos como, por ejemplo; disminución del número de días de recuperación en niños con rotavirus, reducción de la sintomatología en diarreas por antibióticos (3); prevención de enterocolitis necrotizante en recién nacidos prematuros usando lactobacilos GG, disminuyendo la frecuencia de esta patología de 6.6% a 2.8% (6).

1.2 Planteamiento del problema

No se conoce detalladamente como se afecta la microbiota intestinal de infantes durante el consumo de probióticos. La presencia de bacterias externas puede cambiar el ecosistema intestinal y obtener efectos positivos al hospedador que los consume, pero se desconoce en que magnitud puede influir estas modificaciones.

El consumo de la leche materna y de los diferentes alimentos de la dieta transforma la función del intestino y su respuesta inmune; y los cambios que pueden darse en el ambiente en general, influyen en el desarrollo de la microbiota intestinal

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) y la electroforesis por desnaturalización en gel (DGGE) se aplicarían para medir si las heces de los infantes que consumen probióticos se enriquecen con las bacterias de la fórmula, y se compara con los otros dos grupos que no reciben probióticos. Además es importante el seguimiento clínico durante el consumo de probióticos.

1.3 Justificación

La leche materna es el alimento ideal durante los primeros 6 meses de vida; si los infantes reciben leche materna exclusiva, esta proporciona protección frente a agentes microbianos nocivos. Después de este período, la alimentación complementaria es necesaria para satisfacer los requerimientos nutricionales del infante (7). Durante este período que puede extenderse hasta los dos años, hay un reemplazo gradual de leche materna por alimentos que consume la familia (7). También durante la iniciación del período de alimentación complementaria se introducen alimentos o fórmulas en la dieta que causan cambios en la microbiota gastrointestinal (10). El período de alimentación complementaria es una etapa de riesgo nutricional para los infantes, pues las prácticas alimentarias inadecuadas aumentan el riesgo de enfermar por infecciones. Todo esto contribuye a la detención en la ganancia del peso y de longitud, ocasionando desnutrición. Es posible complementar esta función protectora de la lactancia materna con el consumo de bacterias inmunomoduladoras con efecto beneficioso del tipo lactobacilos y bifidobacterias, llamadas probióticos (46).

Muchas funciones han sido atribuidas a la microbiota intestinal normal tales como estimulación de la maduración intestinal, mantenimiento de la función de barrera intestinal, incremento en la absorción de nutrientes, protección contra agentes infecciosos y estimulación del sistema inmune (12).

Hay situaciones que alteran la composición de la microbiota por ejemplo el uso de antibióticos pueden provocar procesos patológicos como síndromes diarreicos. Al contrario, medidas que fomentan el desarrollo y estabilidad de la microbiota como el uso de prebióticos y probióticos han sido asociados con resistencia a las infecciones microbianas (13). Es importante notar que la composición de la microbiota, varía dependiendo de la dieta particular del individuo (14).

La medición de estos cambios debe ser objetiva para inferir con respecto al beneficio del consumo de prebióticos. Hay dificultad en la identificación de las especies bacterianas por métodos convencionales, pues el uso de técnicas de biología molecular está facilitando la investigación. Sin embargo no es fácil el acceso a estos métodos de manera rutinaria. En la última década, se ponen en práctica y son los que han aportado la mayor información sobre la microbiota del intestino humano.

1.4 Objetivos Específicos

4.1. Comparar la microbiota intestinal en infantes que reciben leche materna, fórmula con probióticos además de la comida familiar; leche materna, fórmula sin probióticos además de la comida familiar, y aquellos que reciben leche materna y la comida familiar.

4.2. Comparar el estado nutricional, el desarrollo psicomotor y la morbilidad en infantes que reciben leche materna, fórmula con probióticos además de la comida familiar; leche materna, fórmula sin probióticos además de la comida familiar, y aquellos que reciben leche materna y la comida familiar.

4.3. Realizar el análisis microbiológico de la fórmula con probióticos que contiene *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* usada en esta investigación.

1.5 Hipótesis

Los infantes que consumen fórmulas con probióticos *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus*, a más de la comida familiar tienen una microbiota diferente a los infantes que reciben comida familiar.

El consumo de probióticos incrementa el número de *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* en el contenido intestinal y limita el número de enterobacterias.

El consumo de probióticos disminuye el número de episodios leves, moderados y graves de enfermedad diarreica aguda e infección respiratoria aguda, y beneficia el estado nutricional de los infantes.

Capítulo 2

Marco Teórico

2.1 Fisiología del crecimiento y desarrollo infantil

Los seres humanos atraviesan períodos críticos en el ciclo vital con mayor exposición de su salud que pone en riesgo la vida; como el período de gestación y la infancia; infantes son los niños y niñas comprendidos entre los 0 a 3 años de edad (21).

El desarrollo de la gestación depende del estado nutricional de la madre y de los cuidados prenatales. Posteriormente influye la decisión de alimentar con leche materna exclusiva; para esto la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la lactancia exclusiva hasta los 6 meses de edad, que garantizará al niño/niña tener una mejor salud hasta que llegue el período de la alimentación complementaria, que inicia a los 7 meses de edad y finalmente la participación del infante en la dieta familiar a los 12 meses de edad. El período que va desde los 6 meses hasta los 12 meses es un período crítico porque los infantes se hallan expuestos a agentes infecciosos que pueden causar enfermedad, la orientación que reciba la madre sobre prácticas adecuadas para alimentar a su hijo, contribuirán para registrar un óptimo crecimiento y desarrollo.

El desarrollo cerebral en su mayor porcentaje se logra hasta los dos años de edad, de ahí la importancia en la atención y cuidados que reciban los infantes para mantener una alimentación saludable, una adecuada higiene, una correcta estimulación y demostraciones de afecto por parte de sus cuidadores. Puede presentarse disminución de la ingesta durante esta etapa por varios factores como deficiencia de micronutrientes, problemas emocionales, dietas monótonas, preparaciones poco agradables y la presencia de procesos infecciosos (7).

Fisiológicamente a partir del nacimiento el crecimiento corporal se lleva a cabo a gran velocidad, el mismo que no se repite en otro momento del ciclo de vida. La mejor forma de juzgar la condición nutricional de los niños durante su primer año de vida es por medio de un registro periódico de los valores de peso y longitud en las curvas de crecimiento, se puede evaluar el peso y longitud a una determinada edad y observar el aumento de peso y longitud entre dos mediciones (21).

Una manera de valorar el crecimiento es graficando con un punto el peso y la longitud en las curvas elaboradas por The National Center for Health Statistics en colaboración con The National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, obteniendo el

percentil y con las siguientes tomas “el canal de crecimiento”. El cambio en el canal hacia abajo o un aplanamiento de la curva de crecimiento, indica deterioro del estado nutricional agudo por enfermedad o disminución de la ingesta o por aumento de las necesidades energéticas.

Normalmente los infantes a los 2 meses de edad ganan hasta 900 gramos por mes, de los 2 a los 6 meses ganan 600 gramos mensuales, y desde los 9 meses aproximadamente 300 a 450 gramos por mes; duplicando a los 4 meses el peso al nacer y a los 12 meses el peso del nacimiento se triplica. La ganancia de la longitud hasta los 6 meses es de aproximadamente 16 centímetros y hasta los 12 meses la ganancia total de longitud es el 50% de la longitud al nacer.

2.2 Proceso de maduración del intestino

Al igual que los reflejos y los movimientos oro-faciales se perfeccionan también los epitelios del aparato gastrointestinal sufren una serie de modificaciones desde el nacimiento hasta la edad adulta, la producción de enzimas y secreciones intestinales, conjuntamente con el eje de producción hormonal contribuyen a lograr un aparato digestivo maduro y capaz de digerir, absorber nutrientes y eliminar desechos. La asimilación es progresiva para los diferentes nutrientes de ahí las recomendaciones de iniciar con ciertos tipos de alimentos para luego completar la dieta que debe ser variada y balanceada a los 12 meses de edad (11).

2.2.1 Ontogenia del aparato digestivo

El desarrollo ontogenético del intestino de los mamíferos es un proceso altamente organizado, definiendo un epitelio intestinal especializado en digestión, absorción, funciones endocrinas y funciones inmunológicas. El desarrollo ontogenético puede dividirse en cinco fases (12, 22):

- La morfogénesis (gestación)
- La citodiferenciación y desarrollo fetal incluyendo la preparación del epitelio para la absorción del calostro y leche materna.
- Al nacer, el período temprano de succión.
- Período de succión propiamente dicho.

- El período de destete es decir la transición de la lactancia materna a una dieta sólida, con profundas transformaciones de las funciones digestivas y de transporte, debida a la madurez que adquiere el intestino.

2.2.2 Crecimiento y Desarrollo de la mucosa intestinal

La morfogénesis y la citodiferenciación se deben a la expresión de genes (12). El inicio del desarrollo embrionario intestinal comienza con la formación de las vellosidades y criptas intestinales, con progresiva proliferación de las segundas, según estudios con mamíferos de laboratorio (22).

Durante la citodiferenciación, el epitelio se transforma definitivamente en simple cilíndrico y la membrana celular se caracteriza por tener un lado apical y dos basolaterales con funciones diferentes. De las células “madre” inmaduras y primitivas de las vellosidades y criptas emergen líneas celulares diferentes. La base de esta diferenciación es la intercomunicación celular; la producción de moléculas extracelulares modifica el ambiente que regula la expresión genómica.

2.2.3 Transporte intestinal

La madurez intestinal tiene que ver con los cambios en la absorción frente a diferentes moléculas en la luz intestinal. El transporte de nutrientes en la luz cuando el epitelio intestinal es inmaduro se realiza en todo el espesor de las vellosidades, no así en el intestino maduro que se realiza en la porción superior de la vellosidad, y depende de la variabilidad de la permeabilidad paracelular y de la remodelación de las membranas celulares con fosfolípidos.

La transferencia de macromoléculas (inmunoglobulinas, factores de crecimiento y antígenos incluyendo microorganismos) se realiza en los enterocitos y en las células especializadas llamadas células M.

Al nacer, los nutrientes que provee el calostro y la leche materna se absorben por dos mecanismos: endocitosis y por receptores; el intestino del recién nacido carece de proteasas facilitando que los péptidos lleguen intactos al intestino (tales como factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento insulina dependiente), estos péptidos influyen en la proliferación y diferenciación celular (19, 22).

2.2.4 Absorción y Secreción intestinal

En el último trimestre de gestación la expresión de transportadores permite al feto obtener carbohidratos, aminoácidos y proteínas del líquido amniótico que deglute.

Para la glucosa se desarrollan dos transportadores (GLUT1, GLUT2) y un cotransportador SGLT1; en fetos humanos se realiza por dos vías sodio-dependientes mientras que en el adulto se realiza por un solo transportador sodio dependiente (GLUT2).

Los lípidos (colesterol, ácidos grasos) se absorben desde el nacimiento por pinocitosis, ciertos ácidos grasos a través de receptores en el borde en cepillo, otros por difusión pasiva y otros por portadores; sin embargo la absorción de lípidos en neonatos sigue siendo la más deficiente de todas las etapas de la vida por la deficiencia de lipasas pancreáticas y lipasas intestinales a expensas de la maduración de la circulación entero-hepática y la producción de sales biliares que todavía no aparece al nacer, sino posteriormente. También el intestino tiene la capacidad de sintetizar lípidos, fosfolípidos, y apolipoproteínas.

En tanto hay diferentes formas de absorción de los aminoácidos, una vía sodio dependiente y otro sodio independiente. Las funciones secretoras del intestino proporcionan un medio propicio para la digestión, la absorción, la remoción de agentes nocivos, y vehículo de moléculas como inmunoglobulina A.

2.2.5 Regulación de la función Intestinal

La interrelación celular hace que la regulación sea dependiente de diferentes mecanismos, así:

- Programación genética
- Señales neuroendócrinas: aldosterona, mineralocorticoides, glucocorticoides, corticosteroides, insulina.

El *cierre intestinal* que es la reducción de la absorción de macromoléculas, al parecer está asociado a la acción de algunas hormonas y factores de crecimiento. Las hormonas modulan los cambios postnatales en el transporte intestinal y juegan un rol importante cuando el organismo necesita acelerar y coordinar cambios del desarrollo en todo el organismo como por ejemplo el período de alimentación complementaria. Las modificaciones aparecen debidas a:

- Signos parácrinos.
- Neuromodulación.
- Influencia de la dieta.

Ontogénicamente el intestino se encuentra en presencia de moléculas del líquido amniótico, luego al nacer en presencia de la leche materna, posteriormente a los alimentos sólidos complementarios y finalmente la dieta variada del adulto. Cada una impone demandas diferentes del intestino y cada una influye de manera diferente. La dieta contiene componentes nutritivos y otros no nutritivos. El líquido amniótico, calostro y la leche materna contienen sustancias biológicas activas que estimulan el crecimiento y el desarrollo del epitelio intestinal

La biología molecular y la fisiología son la base del descubrimiento de los mecanismos complejos de regulación de la función intestinal, la investigación en ontogenia permite descubrir los períodos críticos del desarrollo intestinal de manera que la ciencia puede investigar sobre los problemas que aparecen en recién nacidos a término y/o pretérmino y la fisiopatología de los procesos secretores que se presentan en los cuadros diarreicos infantiles (22).

2.3 Leche materna y alimentación complementaria

La leche materna cumple con la función de inmunosupresión debido a que contiene un factor el TGF beta (“transforming growth factor”), este factor puede mediar el efecto de inmunosupresión al regular la respuesta del intestino frente a diferentes antígenos del ambiente y de los alimentos de la dieta (42).

La leche materna cumple además con la función de inmunoprotección, hay estudios que respaldan la hipótesis que linfoblastos del tejido linfoideo intestinal de la madre viajan al tejido mamario e informan a estas células el tipo de anticuerpos que debe producir (23).

La leche materna contiene componentes celulares: neutrófilos, macrófagos, monocitos, linfocitos, eosinófilos, linfocitos T y B, que confieren inmunidad pasiva, que puede explicar la baja morbilidad en infantes que reciben lactancia materna exclusiva (23).

Otros factores protectores transferidos son análogos de los receptores de glicoproteína del epitelio intestinal que previenen el ataque bacteriano. El factor bifidus, la fibronectina, la lactoferrina y lisosimas, además las citoquinas presentes pueden aumentar los efectos

antivirales y despertar la respuesta de la inmunoglobulina A (23). Datos cromatográficos indican que la leche materna contiene: lactosa, glucosa, galactosa, oligosacáridos nitrogenados, que contribuyen a la multiplicación y colonización intestinal de microorganismos específicos con efectos beneficiosos para el infante, promocionando la actividad de *Lactobacillus bifidus* (23). Esta bacteria al degradar la lactosa produce ácido láctico y ácido acético que deriva en una reacción ácida del contenido intestinal, la que bloquea el crecimiento de organismos enteropatógenicos (13).

El inicio de la alimentación complementaria conocida como “ablactación parcial”, “destete” o “weaning” en inglés debe ser *progresivo* y consiste en dar otros alimentos adicionales a la leche materna luego del sexto mes de recibir seno materno exclusivo (8), estos alimentos ofrecen energía y micronutrientes, se espera que al año de edad aproximadamente el 50% de la energía que necesitan los infantes debe cubrirse por otros alimentos y aproximadamente el 50% de la energía debe provenir de la leche materna, que para esta época se vuelve insuficiente para cubrir las demandas energéticas (21, 53).

2.3.1 Requerimientos de micronutrientes y vitaminas, durante el crecimiento y desarrollo infantil

La etapa de alimentación complementaria coincide con el término de la maduración fisiológica del aparato oral-gastrointestinal (producción de enzimas, secreciones intestinales) (25). Los alimentos complementarios o “alimentos de transición” deben cubrir las necesidades energéticas y proporcionar los micronutrientes y vitaminas que el infante necesita.

Las características de los alimentos de transición son (24):

- Ricos en energía y nutrientes.
- Limpios y seguros.
- De fácil preparación y ser de uso común de entre los alimentos familiares.
- Alimentos locales, fáciles de conseguir.

Se debe vigilar que se consuman alimentos ricos en micronutrientes como hierro para prevenir el apareamiento de anemia, y también ricos en calcio, zinc, vitamina A, vitamina C y folatos además de ser energéticamente densos especialmente desde los 6 a los 12

meses. Los requerimientos diarios de diferentes nutrientes se encuentran en detalle en el Cuadro 1.

La limpieza y seguridad implica que el consumo no ocasione problemas ya sean infecciosos o no, que no contengan agentes químicos o toxinas, ni huesos, ni elementos no digeribles que puedan ocasionar lesiones en boca y mucosas, ni demasiado calientes que ocasionen quemaduras, que no contengan sal o condimentos picantes; deben ser alimentos suaves, fáciles para preparar y comer. Se encuentra más información en la guía de alimentación complementaria del Cuadro 2. La combinación de alimentos complementarios logra mezclas energéticas y nutritivas adecuadas para las necesidades (24).

Cuadro 1. Requerimientos de nutrientes en la Infancia	
DENSIDAD ENERGETICA	4.2 kJ/g de comida (0.6kcal/g a los 6-8 meses y de 1kcal /g de los 12-23 meses)
REQUERIMIENTOS DE HIERRO	4mg/ 100kcal para infantes entre 6-8 meses, 2.4mg/ 100kcal entre los 9- 11 meses, y 0.8mg/ 100kcal para infantes entre 12- 24 meses. Se pueden incluir alimentos fortificados.
REQUERIMIENTOS DE ZINC	0.8mg/ 100kcal en infantes entre 6-8 meses de edad y 0.5mg/ 100kcal en infantes entre 9-11 meses de edad. Incluir alimentos como carnes, pescados, derivados lácteos ricos en zinc. Mantener niveles bajos de fitatos para prevenir la poca absorción de minerales (calcio, zinc)
REQUERIMIENTOS DE PROTEINAS	Promedio de 0.7 g/ 100kcal entre los 6- 24 meses de edad
REQUERIMIENTOS DE AGUA	Las bebidas y el agua puede ocasionar dilución de la densidad energética, ocasionando problemas en los requerimientos diarios, por la pequeña capacidad gástrica de los infantes. (capacidad gástrica 30-40ml/ kg de peso)
CANTIDAD Y FRECUENCIA DE LOS ALIMENTOS COMPLEMENTARIOS	Los alimentos deben ser introducidos uno a la vez con intervalo de 3 a 7 días y la frecuencia de las comidas hasta 3 diarias más 2 refrigerios, intercaladas con leche materna. La higiene durante la preparación de alimentos complementarios debe mantenerse durante la preparación, almacenamiento (recipientes, refrigeración), administración de los alimentos al infante. Se recomienda el uso de taza y cuchara para administrar los alimentos.
Elaborada por la autora en base a diferentes lecturas.	

Cuadro 2. Guía y recomendaciones en alimentación complementaria	
Mayores de 4 meses	Alimentación con leche materna cuantas veces el niño desee alrededor de 8 veces en 24 horas.
Niños desde los 6 meses.	Leche materna a menudo, las veces que el niño desee alrededor de 8 veces en 24 horas. Solo dar otras comidas si el niño: parece con hambre luego de la leche materna, si no tiene una ganancia adecuada de peso, se da alimentos complementarios 1 o 2 veces por día después de la leche materna.
Niños de 6 a 12 meses	Leche materna las veces que el niño desee. Dar porciones de: papillas de maíz, yuca, soya. Añadir azúcar, aceite mezclado con leche o semillas oleaginosas. Mezclas de comida aplastada mandioca, papa o yuca o maíz o arroz, mezclado con pescado o granos o semillas y vegetales verdes. Dar 3 comidas por día si recibe leche materna. Dar 5 comidas por día si no recibe leche materna. Dar colaciones nutritivas entre comidas: huevo, plátano o pan.
Niños de 12 meses a 24 meses	Leche materna las veces que el niño desee. Dar porciones de: Mezclas de comida aplastada mandioca, papa o yuca o maíz o arroz, mezclado con pescado, o granos o semillas y vegetales verdes. Dar 3 comidas por día y 2 colaciones
Fuente Ref. (53)	

2.3.2 Consecuencias de una mala alimentación complementaria

La energía requerida según el Dietary Reference Intakes (DRI) 2002 en el Cuadro 3, para la edad de 0 a 6 meses en varones es de 95 kilocalorías /kg de peso - día y en mujeres 86.6 kilocalorías /kg de peso - día; en infantes de 6 a 12 meses para varones 82.5 kilocalorías /kg de peso - día y para mujeres de la misma edad 75 kilocalorías / kg de peso - día (52).

Cuadro 3. Referencia dietética en la ingesta. (DRI 2002)		
Edad	Hombres Kcal / Kg peso / día	Mujeres Kcal / Kg peso / día
0 – 6 meses	95.0	86.6
6 – 12 meses	82.5	75.0
Fuente Ref. (52)		

Se podría alimentar inadecuadamente a los infantes, cuando hay falta de información y conocimientos, por falta de recursos económicos o por una mala combinación de los alimentos, y esto puede llevar al desarrollo de un problema de malnutrición. Niñas y niños malnutridos pueden sufrir fácilmente de infecciones con el consecuente incremento de la morbilidad y mortalidad infantil.

2.3.3 Susceptibilidad de los infantes a las enfermedades infecciosas

La situación de pobreza en países en vías de desarrollo facilita el apareamiento de enfermedades infecciosas durante el período de alimentación complementaria que favorece la interrupción del crecimiento y desarrollo infantil. La falta de crecimiento ocurre con más frecuencia entre los 6 a 18 meses de edad. Es multifactorial pero los más importantes son la alta frecuencia de infecciones y la pobre ingesta de alimentos (26).

Cuando la familia no cuenta con las condiciones socioeconómicas básicas como agua potable y alcantarillado, la alimentación complementaria se asocia a un mayor número de episodios infecciosos. El lavado de manos y el cortado de uñas es una práctica inconstante y se ha observado que no hay gran preocupación por usar utensilios limpios para los infantes a la hora de comer. Los episodios infecciosos está asociada también a la baja la escolaridad de los cuidadores.

2.3.4 Incidencia de la morbilidad y mortalidad infantil por infecciones gastrointestinales y respiratorias

El número de episodios de diarrea aguda en menores de 5 años en países en vías de desarrollo es de 3 episodios por año, sin embargo en algunas regiones los episodios son de 6 a 8 por año (27). La mortalidad por diarrea aguda tiene un estimado de 3 millones de muertes por año en el mismo grupo de edad (OMS 1995) (27). La causa de las enfermedades diarreicas es la falta de agua segura, los alimentos preparados bajo pobres condiciones de higiene que ocasiona la contaminación con patógenos. La diarrea está asociada con malnutrición, la comida contaminada es responsable del 70% de episodios de diarrea. El 25% de las diarreas están ocasionadas por *Echerichia coli* patógena, otros enterobacterias son *shigella* y *vibrio cholerae* (28).

Las infecciones respiratorias son la primera causa de morbilidad en infantes, es la primera causa de hospitalizaciones; la etiología principal son los virus respiratorios, la frecuencia

de los episodios de infecciones respiratorias en niños en el primer año de vida es de 5 a 7 por año. (Ver Cuadro 4)

La asociación entre infecciones y malnutrición es responsable de 13 millones de muertes por año de infantes menores de 5 años alrededor del mundo (28). El período de alimentación complementaria resulta de riesgo por la exposición a agentes infecciosos si no se asegura normas higiénicas adecuadas.

Cuadro 4. Frecuencia de infecciones respiratorias agudas y enfermedad diarreica aguda en la infancia	
TIPO DE INFECCION	EPISODIOS/AÑO EN MENORES DE UN AÑO
RESPIRATORIAS AGUDAS	5 – 7
DIARREICAS AGUDAS	2 – 3 (países en desarrollo 6 – 8)
Fuente Ref (27) y referencia prácticas pediátricas H.Urbina MD Quito-Ecuador 2005	

2.3.5 Estado nutricional y su relación con las infecciones

Un buen estado nutricional garantiza que cualquier agresión física, ambiental o infección no se complique durante el tiempo que esta dure. Los niños con desnutrición tienen un elevado riesgo de problemas infecciosos, aumentando el riesgo de morir por esta causa. Las más frecuentes son las infecciones diarreicas agudas y las infecciones agudas respiratorias.

La desnutrición facilita el apareamiento de las infecciones, la fisiología de la inmunidad del individuo desnutrido está afectada, así barreras naturales como piel y mucosas son de mala calidad, las secreciones que ayudan a resistir las infecciones son ineficientes. Hay afectación de la fagocitosis (inmunidad innata) además de la inmunidad humoral y celular (inmunidad adquirida).

La deficiencia específica de ciertos micronutrientes y vitaminas (zinc y vitamina A) puede facilitar el apareamiento de infecciones (24).

Es importante la vigilancia de las malas prácticas alimenticias que pueden contribuir a poner en riesgo a los infantes frente a las infecciones, por ejemplo demorar el reinicio de la ingesta de alimentos durante los episodios de diarrea o escoger dietas monótonas por tiempos prolongados, las cuales privan de nutrientes indispensables para la recuperación

posterior al aparecimiento de una enfermedad. La malnutrición puede favorecer las infecciones incluso por mecanismos no específicos que quedan por definirse, estos incluyen alteraciones de la mucosa intestinal en malnutridos, con pobre absorción de grasas y otros nutrientes, inflamación intestinal por incremento de las concentraciones de ácidos biliares libres, cambios en la composición de la microbiota y predisposición a las diarreas en general (29).

Las infecciones por su parte predisponen a una disminución del consumo de alimentos y hay una deficiente absorción de los pocos nutrientes ingeridos, aumentan los requerimientos energéticos por la presencia de fiebre, además aumenta el catabolismo como parte de la evolución natural de la enfermedad; aumentan las pérdidas urinarias y aumentan el secuestro de nutrientes que deberían utilizarse para la síntesis de tejidos durante el crecimiento, contribuyendo a mantener y agravar el mal estado nutricional del individuo (24, 30, 31). Se ha observado que la presencia de infecciones puede disminuir la ganancia de peso diario (32). Es un círculo que fácilmente confunde durante el abordaje terapéutico inicial, sobre que controlar primero.

En el Cuadro 5 se consideran los factores nutricionales y infecciosos como causa – efecto de la desnutrición. Es necesario convertirse en agentes de salud que prevean los posibles problemas que pueden aparecer en la salud infantil, para evitar complicaciones que llevan a un mayor gasto de recursos y pueden costar la vida de la población infantil.

Es importante la correlación que se observa entre el aparecimiento de infecciones y la falla del crecimiento cuando se registra en las curvas de crecimiento los pesos y longitudes en niños menores de 5 años. El desmedro del desarrollo se acompaña de lento desarrollo mental de los individuos desnutridos determinando su capacidad productiva en el futuro (33, 34).

Cuadro 5. Factores relacionados entre Malnutrición y las Infecciones en infantes	
CARACTERISTICAS DE LA MALNUTRICION QUE PREDISPONEN A LAS INFECCIONES	CARACTERISTICAS DE LAS INFECCIONES QUE FAVORECEN LA MALNUTRICION
Disminución de la ingesta	Disminución de la ingesta
Afectación de la mucosa intestinal	Deficiencia de la absorción de micronutrientes
Disminución de la Vitamina A y Zinc	Aumento de los requerimientos de la energía
Cambios en la microbiota	Aumento del catabolismo
Afectación de la fagocitosis	Aumento de la pérdida urinaria de nutrientes
Aumento de la concentración de ácidos biliares	Secuestro de nutrientes
Elaborada por la autora en base a lecturas realizadas	

2.4 Microbiota

La diversidad de la microbiota en el intestino humano al parecer se debe a la selección por parte del hospedador y la coevolución con éste (12).

La división Cytophaga – Flavobacterium - Bacteroides (CFB) es la más numerosa en mamíferos. Este grupo de bacterias se ha adaptado mejor al intestino de estos animales y a su estilo de vida, consiguiendo cambios en el hospedador como obtención de energía extra del consumo de nutrientes asimilados (12). La selección de las bacterias es dependiente de la producción de inmunoglobulina A específica por parte de linfocitos B en el intestino del huésped, llamado fenómeno de *inmunoexclusión* (4). Por su parte las bacterias son capaces de adaptarse a los cambios de vida del hospedador, la dieta y la inmunidad.

Es importante describir que el estudio científico en laboratorio con animales libres de gérmenes, desde hace 50 años por Reyniers en la Universidad de Notre Dame ha permitido obtener los conocimientos que actualmente existen sobre la influencia de la microbiota en el sistema inmune intestinal (39). Las bacterias forman líneas celulares con capacidad de comunicarse entre sí y con el hospedador, aunque el mecanismo como lo hacen no es claro, estas bacterias consumen, almacenan, redistribuyen energía, son mediadores fisiológicos e intervienen en transformaciones químicas; además, pueden mantenerse y repararse a sí mismas (4).

Hay una interacción dinámica entre la mucosa intestinal y las bacterias con consecuencias funcionales en el intestino y en el cuerpo. Los cambios adaptativos que ocurren cuando las bacterias colonizan al hospedador siguen investigándose hasta la actualidad (12). Hay dos dificultades para entender y medir la compleja microbiota, ya que menos del 50% de estas bacterias pueden ser cultivadas y otra causa es que el conteo bacteriano se realiza en muestras de contenido colónico, debiendo considerarse que las bacterias además se quedan adheridas a la mucosa del intestino, o en las criptas profundas de la misma, no pudiendo cuantificar objetivamente el verdadero aporte de la comunidad microbiana al intestino.

2.4.1 Relación Bacterias – Hospedador

La comunidad microbiana gastrointestinal se caracteriza por ser de una alta densidad, diversidad y complejidad. Las bacterias en más del 99% son anaerobias (40). Se ha estimado que el colon humano contiene más de 10^{11} células bacterianas por gramo de

contenido, superando en número diez veces el número de células humanas. Las bacterias desarrollan una profunda influencia en la inmunidad, en la nutrición, en la fisiología y en los procesos de protección del huésped, se describirá más adelante en tema inmunidad intestinal.

Se distinguen alrededor de 400 a 1000 especies bacterianas (12). Algunos autores las consideran como “otro órgano” u “órgano microbiano” del cuerpo humano (4), con funciones que cumple en su relación con el hospedador, afectando de una manera u otra la salud del individuo. Hay bacterias en la piel, en las vías urinarias, en el tracto digestivo, y cumplen un papel trascendental en los mecanismos de defensa del organismo. Las bacterias habitan el tracto digestivo desde la cavidad oral, estómago, intestino delgado, ileon, e intestino grueso. En el tracto digestivo las concentraciones de bacterias varían de acuerdo a la región intestinal (Ver Cuadro 6).

Cuadro 6. Microbiota Gastrointestinal en el humano (ufc/gramo)				
	Estómago	Yeyuno	Ileon	Colon
Bacterias Totales	0 – 10 ²	0 – 10 ⁵	10 ³ – 10 ⁵	10 ¹⁰ – 10 ¹²
Bacterias Aeróbicas o Anaeróbicas Facultativas				
Enterobacterias	0 – 10 ²	0 – 10 ³	10 ² – 10 ³	10 ⁴ – 10 ¹⁰
Estreptococos	0 – 10 ³	0 – 10 ⁴	10 ² – 10 ⁶	10 ⁵ – 10 ¹⁰
Estafilococos	0 – 10 ²	0 – 10 ³	10 ² – 10 ⁵	10 ⁴ – 10 ⁷
Lactobacilos	0 – 10 ³	0 – 10 ⁴	10 ² – 10 ⁵	10 ⁶ – 10 ¹⁰
Hongos	0 – 10 ²	0 – 10 ²	10 ² – 10 ³	10 ² – 10 ⁶
Bacterias Anaeróbicas				
Bacteroide	Raros	0 – 10 ²	10 ³ – 10 ⁷	10 ¹⁰ – 10 ¹²
Bifidobacterias	Raros	0 – 10 ³	10 ³ – 10 ⁵	10 ⁸ – 10 ¹²
Cocos gram positivos	Raros	0 – 10 ³	10 ² – 10 ⁵	10 ⁸ – 10 ¹²
Clostridios	Raros	Raros	10 ² – 10 ⁴	10 ⁶ – 10 ¹¹
Eubacterias	Raros	Raros	Raros	10 ⁹ – 10 ¹²
Fuente Centro de investigaciones Nestlé. Nestlé NAN 2. 2004				

La microbiota es un ecosistema bacteriano que estimula y modula la actividad celular y humoral del hospedador (48). Las bacterias del tracto digestivo humano constituyen un

complejo conglomerado que cambia o se modifica en el tiempo, las bacterias se agrupan dependiendo de algunas características que comparten como el tiempo de permanencia en el intestino y/o por las relaciones que establecen con el hospedador.

Existen las llamadas bacterias patógenas y no patógenas, las que se encuentran de manera dominante en el intestino y las no dominantes. Las bacterias patógenas o enterobacterias capaces de desarrollar mecanismos que alteran la funcionalidad del epitelio intestinal como cambios de la permeabilidad, de las secreciones e incluso destrucción del epitelio por invasión o por liberación de toxinas bacterianas, que ocasionan en el individuo lesiones parciales o totales y enfermedad temporal o crónica con deterioro de la salud. Las bacterias patógenas en general tienen la capacidad de ponerse en contacto con el epitelio intestinal a través de receptores epiteliales. Estas demuestran su patogenicidad a través de: adhesión, internalización, y transcitosis (43), que depende de la carga bacteriana. La mucosa intestinal con sus células puede detener la proliferación de bacterias y destruirlas antes de que colonicen el intestino. Actualmente la clasificación de las bacterias se define por la secuencia de sus genes.

En el intestino infantil el reconocimiento y producción de anticuerpos demora en aparecer y por ello son más susceptibles que los adultos a enfermar. Muchos de estos anticuerpos son transferidos a través de la leche materna, siendo una ventaja particular de los niños/niñas alimentados con leche materna este tipo de defensa (23).

Las bacterias que viven en el intestino sin causar daño al huésped se denominan bacterias no patógenas o microbiota normal. En el intestino animal se ha reconocido que las bacterias intestinales por la fermentación de diversos polisacáridos de la dieta aportan al hospedador monosacáridos, ácidos grasos de cadena corta, de manera que el hospedador gana carbones y energía mientras las bacterias aprovechan de los nutrientes que están en el intestino para seguir existiendo (4). Esta relación hospedador – bacterias se la ha calificado de diferentes maneras: comensalismo, mutualismo, simbiosis.

El comensalismo es la condición en que al estar en contacto dos organismos el uno se beneficia y el otro aparentemente no se afecta (39). El mutualismo es la condición en la que al contactarse los dos organismos, ambos experimentan un mejoramiento del estado de vida. (4) y la simbiosis se asemeja a la mutualismo es la asociación entre dos organismos de especies distintas, que resulta beneficiosa para cada una de ellas.

Se distinguen en la microbiota del intestino bacterias autóctonas o “indigenous” (indígenas o nativas), las cuales son microorganismos inocuos que forman parte del ecosistema gastrointestinal, y que se distribuyen en todos los nichos disponibles en el tracto digestivo (40). Y el otro tipo son las denominadas bacterias “allochthonous” encontradas en el tracto digestivo pero de manera transitoria derivadas del consumo de agua, o comida; pueden colonizar el intestino si las circunstancias son anormales.

Algunas bacterias “patógenas” permanecen autóctonas sin afectar al huésped hasta que transforman su comportamiento cuando el ecosistema del intestino cambia.

El término colonización se define, cuando las bacterias están en un número considerable, por tiempo adecuado, sin que sea necesaria la introducción de dosis orales repetidas de bacterias, y se multiplican excediendo la tasa de eliminación.

En el intestino humano se han identificado 8 “divisiones” de bacterias de las 55 “divisiones” encontradas en seres vivos y en el suelo; de las 8, 3 “divisiones” son dominantes en el intestino, estas son la división Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB), la división Firmicutes y la división Proteobacteria. Entre la primera y la segunda corresponden aproximadamente al 30% de las bacterias del intestino humano (4).

Tenemos 10^{14} bacterias en el intestino, de las cuales $10^6 - 10^{10}$ bacterias son de tipo dominante y 10^6 bacterias son no dominantes (41).

2.4.2 Establecimiento de la microbiota intestinal

El intestino humano es estéril dentro del útero materno y el establecimiento de la microbiota tiene que ver con el tipo de parto, con el tipo de dieta, con el ambiente, con la condición de salud, y la posible “suplementación” de microorganismos. Al nacer los microorganismos originarios de la madre y del ambiente que le rodea ingresan al cuerpo del recién nacido. Está bien establecido que el tipo de parto tiene efecto en el desarrollo de la microbiota intestinal (20).

En el parto vaginal la colonización de boca y estómago del recién nacido depende de los mismos serotipos de *Echerichia coli* de las heces de la madres. En un estudio el contenido gástrico de los bebés fue similar a la muestras de cérvix maternos, de igual maneja las nasofaringes de los bebés contenían las bacterias de las vaginas maternas (40). Se considera que este tipo de colonización podría prevalecer de generación a generación.

Mackie (40) en una revisión de diferentes estudios concluye la identificación de 18 grupos de bacterias, 10 grupos bacterianos aerobios y 8 grupos bacterianos anaerobios en los genitales de mujeres embarazadas y que a su vez estuvieron presentes en muestras de heces de neonatos, infantes y adultos; como dato de la sucesión bacteriana en las diferentes etapas de la vida.

Los niños que nacen por cesárea se exponen a la microbiota de la madre pero además a las bacterias presentes en los equipos y sala quirúrgicos, luego a los microorganismos del ambiente y a los de la boca y piel de la madre. Estos se transfieren mecánicamente por la succión, los besos y las caricias, posteriormente la exposición bacteriana continúa con la alimentación.

La leche materna de madres saludables contiene 10^9 bacterias por litro, las bacterias más frecuentes son: estafilococos, estreptococos, corinebacterias, lactobacilos, micrococos, propionobacterias, y bifidobacterias; que provienen de la piel, del pezón y de los conductos lactóforos. Si la alimentación es a base de fórmula infantil, muchas de las bacterias que se ingieren derivan del proceso de reconstitución líquida de la fórmula (40).

Según la dieta que reciben los infantes la sucesión bacteriana difiere en recién nacidos. El intestino de bebés humanos inicialmente contiene bacterias anaerobias facultativas, incluyendo *Echerichia coli* y estreptococos, en las primeras 24 horas de nacido (39, 40, 42). Al segundo día aparecen coliformes, lactobacilos y enterococos y al tercer día llegan a establecerse los *Bacteroides sp* y otros anaerobios como *Clostridium*.

La colonización con *E coli* y estreptococos permite un ambiente apropiado para la sucesión de la colonización con bacteroides, *Bifidobacterium* y *Clostridium* (14). Las bifidobacterias se establecen al quinto día especialmente en los alimentados con leche materna reduciendo la colonización por bacteroides y enterobacterias. Las bacterias Gram positivos predominan en el intestino proximal mientras las bacterias Gram negativos predominan en el intestino distal, ileon y colon (14).

Además pueden encontrarse otras especies colonizando el intestino que provienen del ambiente en donde crece el infante y pueden incluirse otros grupos como: eubacterias, veillonelas, estafilococos, propionobacterias, bacilos, fusobacterias (40).

Las bifidobacterias en algunos infantes no son detectables en las heces hasta la introducción de alimentos sólidos, o no son detectadas cuando en la microbiota hay un alto

número de bacteroides, clostridios y *E coli* (40). La colonización intestinal varía conforme avanza la edad, hay cambio de ambiente y dieta. (Ver Figura 1)

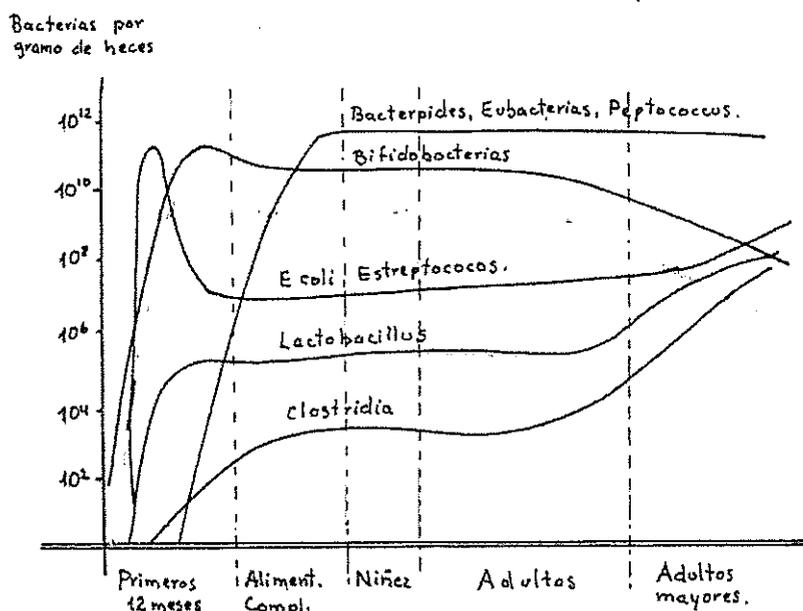


Figura 1. Sucesión de la microbiota con la edad.

Fuente Ref. (62)

La diferencia encontrada entre los alimentados con seno materno y los infantes alimentados con fórmula es la presencia del grupo bacteriano clostridia en los infantes alimentados con biberones. La incidencia de clostridia fue más alta en los alimentados con fórmula (49-66%) que en los alimentados con seno materno (6-20%), la colonización en niños mayores con clostridia fue del 4% y en adultos 0.7%. Harmsen (14) encontró en niños alimentados con fórmula estas bacterias: bacteroides, enterobacterias, enterococos, además de clostridios y bifidobacterias.

2.4.3 Factores que afectan la sucesión bacteriana

Hay factores externos e internos que pueden afectar la sucesión de bacterias. Los factores externos son ambiente, alimentos, hábitos alimentarios y la composición de la microbiota materna; además, intervienen el consumo de oligosacáridos (prebióticos) los cuales modifican los sustratos del ambiente intestinal y por tanto la microbiota (15). Esto sucede de forma natural con la leche materna la cual contiene monosacáridos, factores de

crecimiento y factores antibacterianos. Los factores que afectan la sucesión bacteriana son:

- Fisiología del huésped: el peristaltismo intestinal, los ácidos biliares, las secreciones intestinales, las respuestas inmunológicas, el pH intestinal, los receptores bacterianos en la mucosa intestinal.
- Los nutrientes endógenos, sustratos obtenidos de la dieta.
- La propia microbiota: interacciones microbianas.
- Los productos derivados del ecosistema.
- Las terapias con drogas; antibióticos.

Durante la introducción de alimentos complementarios se desarrolla una alta actividad inmunológica, observándose expansión de los linfocitos intraepiteliales, incremento de la actividad de los linfocitos T, elevación de la triptasa y gama interferón. Histológicamente hay hiperplasia de las criptas intestinales a expensas de células T (42).

En ratones se observó disminución de la activación de células T en el día 23, luego de iniciar la alimentación con sólidos y en infantes humanos una disminución de IL-2R a los 4 meses posterior al inicio de la alimentación. Finalmente se llega a un estado de *tolerancia oral* que impide una mayor actividad inmunológica (42).

Los mecanismos de *tolerancia oral* incluyen, limitación de expansión clonal de células T, anergia y producción de citoquinas inmunosupresoras tales como IL-4, IL-10 y TGF-beta. En ratones se observó cese clonal y anergia a los antígenos en las placas de Peyer después del inicio de alimentación oral, aunque TGF-beta todavía se producía (42).

Holt (42) enfatiza que el período de la infancia es una época que puede definir dos procesos inmunes extremos: por un lado una inmunidad protectora y tolerante y por otro una respuesta inmune alérgica patológica. La transformación y adaptación inmunológica es un proceso continuo, sucesivo un acontecimiento tras otro, dependiente de la participación del hospedador y de las bacterias (40).

Cooperstock y Zedd (10) dividen en cuatro fases el desarrollo microbiano en el intestino humano. (Ver Figura 2)

- Inicial o fase de adquisición (1- 2 semanas)
- Período de lactancia
- Período de transición entre alimentación complementaria y lactancia

- Periodo en que se completa la alimentación de sólidos y paso a la dieta familiar (hasta los 2 años de vida).

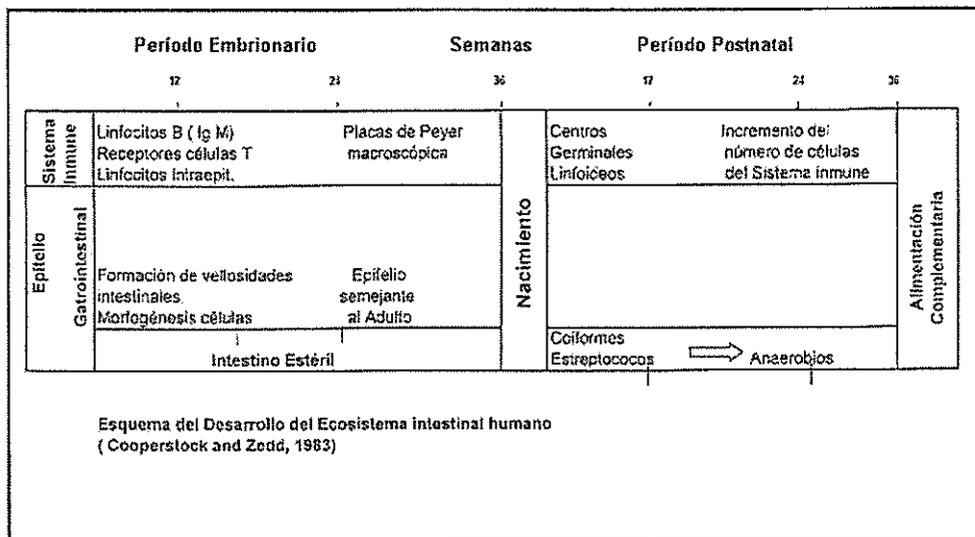


Figura 2. Esquema del desarrollo del ecosistema intestinal humano.

Adaptado por la autora.

Fuente Ref. (10)

Agnes Wold (12) de la Universidad de Goteborg en Suecia propuso que la higiene exagerada y el uso de antibióticos y su consecuente efecto sobre la microbiota han incrementado los desórdenes en la autoinmunidad tales como las alergias, es la conocida teoría de la higiene.

La microbiota interfiere en diferentes aspectos de la salud – enfermedad así en el grupo de las llamadas enfermedades intestinales crónicas ocurre que hay una disrupción de la interacción entre el intestino y la microbiota desarrollando una respuesta inmune inapropiada para el organismo (39).

2.4.4 Distribución de la microbiota intestinal

En ratones de laboratorio se ha detectado en el estómago y el intestino delgado bajas densidades bacterianas de 10^3 y 10^5 organismos por gramo de contenido luminal. Se

caracteriza por un pH ácido, con desarrollo principalmente de lactobacilos y estreptococos.

La porción distal del intestino delgado es una zona de transición, con una densidad de 10^8 por gramo de heces y gran diversidad de especies que se desarrollan a un pH menos ácido. La colonización más densa es en el intestino grueso con 10^{10} a 10^{12} por gramo, principalmente anaerobios como: bacteroides, bifidobacterias, fusobacterias y peptoestreptococos, bacterias facultativas que incluyen enterobacterias y lactobacilos, están presentes en moderadas densidades como 10^6 y 10^8 por gramo de contenido intestinal en ratones(40).

En el intestino humano hay una distribución bacteriana que tiene que ver con factores que contribuyen al desarrollo de cada especie.

Las bacterias no solo se encuentran en el lumen del intestino sino que se encuentran también en la capa de moco que cubre el epitelio de todo el tracto digestivo, en la capa profunda de las criptas intestinales y en la superficie de las células epiteliales de la mucosa (40).

2.5 Fisiología de la microbiota asociada a la inmunidad

La barrera intestinal está formada por un epitelio cilíndrico simple, cada célula intestinal se caracteriza por un borde apical, dos basolaterales y las uniones intercelulares (“tight junctions”) cumplen con funciones secretoras de moco y defensinas (43).

Los estudios sobre microbiota revelan que las funciones del sistema inmune intestinal se deben parcialmente a la información dada a través de los genes y que el total de la función esta dada por la interacción al ponerse en contacto con las bacterias que colonizan el intestino, las cuales definen el desarrollo inmunológico (39).

No sucede lo mismo con animales de laboratorio colonizados por un solo tipo de bacterias, o en modelos animales libres de gérmenes, de ahí que se concluye que el intestino humano necesita de sociedades bacterianas diversas para lograr la función definitiva en el sistema de defensa (39).

El tejido linfoideo asociado al intestino o “gut-associated lymphoid tissue” (GALT) en inglés, es el más importante del organismo. En este lugar se encuentran el 70% de células linfoideas del cuerpo. El sistema inmune detecta continuamente los cambios que pueden ocasionar agentes externos y el sistema inmune intestinal lo propio en la mucosa, incluidos

los cambios de la microbiota. Es importante observar que el sistema inmune intestinal cumple con mecanismos de defensa ante bacterias patógenas, además de una respuesta hiporeactiva frente a las partículas antigénicas de los alimentos y a las bacterias no patógenas, manteniendo la homeostasis interna, o tolerancia oral específica.

Los animales libres de gérmenes es un modelo animal experimental que se caracteriza por usar cámaras especiales asépticas, con uso de guantes estériles, empleando agua y alimentos estériles y obteniendo las crías por cesárea, bajo el concepto de que los úteros de las madres son estériles, y luego se obtienen generaciones de animales libres de gérmenes, con los cuales se puede estudiar los tejidos, las expresiones genéticas, las características histológicas que han evidenciado las diferencias con animales de ambientes comunes y que en resumen tiene que ver con la inmunidad innata y la inmunidad adquirida del hospedador (10, 12, 44).

En estos animales libres de gérmenes, prácticamente se ha detectado un sistema inmune subdesarrollado con: morfología intestinal alterada, falta de degradación del moco producido por las células caliciformes, placas de Peyer pequeñas, nódulos linfáticos sin centros de germinación, células de Paneth de menor tamaño, reducida quimiotaxis de los macrófagos, disminución de los linfocitos encargados de la supresión, pocas secreción de inmunoglobulina A, M y G, y alteración de la respuesta enteroendócrina (44).

Gracias a los estudios de investigación en estos modelos experimentales, se tiene conocimientos sobre la intervención de la microbiota en el desarrollo de la inmunidad.

2.5.1 Estructura del epitelio y tejido linfoide intestinal

Las capas del intestino son la mucosa intestinal, la lámina propia, la muscularis mucosa, la musculatura lisa, y la serosa. Interesa conocer mejor la estructura de la mucosa y lámina propia del intestino.

El epitelio es la primera línea de defensa cuando las bacterias invaden, constituye por sí solo la barrera física (inmunidad innata) que evita la penetración de las bacterias, junto con el moco, la inmunoglobulina A y las moléculas antimicrobianas. El epitelio participa activamente en la producción y secreción de péptidos con efecto antimicrobiano a la luz del intestino por intermedio de las células de Paneth, las cuales son sensibles a la presencia bacteriana.

El epitelio intestinal está formado por dos tipos de células: las células epiteliales intestinales (intestinal epithelial cells – IEC) y los linfocitos intraepiteliales (intra-epithelial lymphocytes – IEL). Los IEC son parte de la defensa innata, son las primeras células que se ponen en contacto con los antígenos e inicia los mecanismos de defensa, son las encargadas de preservar la homeostasis interna intestinal frente a la microbiota y a sus productos. Los IEL son probablemente las primeras células con las que reaccionan los antígenos bacterianos y antígenos alimentarios, contribuyen a mantener la homeostasis, son linfocitos T que se producen en las placas de Peyer, aunque Eberl y Littman de la Universidad de New York de la Escuela de Medicina de New York y Guy Grand (39) y colegas del Instituto Pasteur en París aseguran que los linfocitos intraepiteliales se desarrollan primero en el timo y luego viajan al intestino.

Los elementos de la lámina propia son las placas de Peyer, las células de Paneth, las células M, las células dendríticas, las células B y células T.

Las Placas de Peyer son conglomerados linfoideos cubiertos por epitelio permeable a moléculas y bacterias (39). Las bacterias modulan la activación y multiplicación de los linfocitos B y linfocitos T de las placas de Peyer, que actúan en la presencia de bacterias.

Las células de Paneth son células que sintetizan péptidos antibacterianos y enzimas; las bacterias alteran la expresión de angiogenina-4 una proteína que actúa como bactericida, es sintetizado por las células de Paneth y actúa sobre bacterias gram positivas tales como *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis* (39). Las células de Paneth deben ponerse en contacto con bacterias de la microbiota para lograr la producción de dicha sustancia, los animales libres de gérmenes no alcanzan niveles altos de angiogenina -4 en estudios realizados.

Las células M son las células especializadas en la presentación de antígenos, se intercalan con las células epiteliales de la mucosa presentes en el intestino y el pulmón, solo aparecen tras el contacto con la microbiota (22). Tienen la capacidad de adherencia y de transporte, se caracterizan por tener pocas microvellosidades (4).

Las células dendríticas son macrófagos con prolongaciones que atrapan bacterias comensales en su interior y las llevan a las placas de Peyer sin pasar por los nódulos linfáticos mesentéricos, posiblemente en respuesta a acción de inmunoglobulina A y al estímulo producido por las células T (12).

Las células B y T o linfocitos B y T son activadas en las placas de Peyer las cuales recirculan a través de los nódulos linfáticos, entran a la circulación general hasta el conducto torácico y regresan a la lámina propia del intestino (12). Los linfocitos B además son productoras de inmunoglobulina A e inmunoglobulina G.

2.5.2 Modulación de la inmunidad innata y adquirida por la microbiota

La resistencia natural a las infecciones depende de la mucosa intestinal como barrera de defensa innata, junto a sus secreciones, y las funciones que cumplen las células inmunológicas como la fagocitosis (48).

En la Figura 3 se presenta un esquema de interacción de la microbiota y el ambiente intestinal que facilita el apareamiento de cambios fisiológicos de beneficio para el huésped.

Las mayores contribuciones de las bacterias en la inmunidad adquirida son:

- Formación de estructuras anatómicas e histológicas, incluidas placas de Peyer, y el consecuente desarrollo de linfocitos B y T.
- Expansión de los centros germinales de las placas de Peyer.
- Incremento en la producción de inmunoglobulina A por los linfocitos B.
- Diversidad en la producción de anticuerpos (observado en conejos de laboratorio)
- Expansión de las poblaciones de linfocitos intraepiteliales.

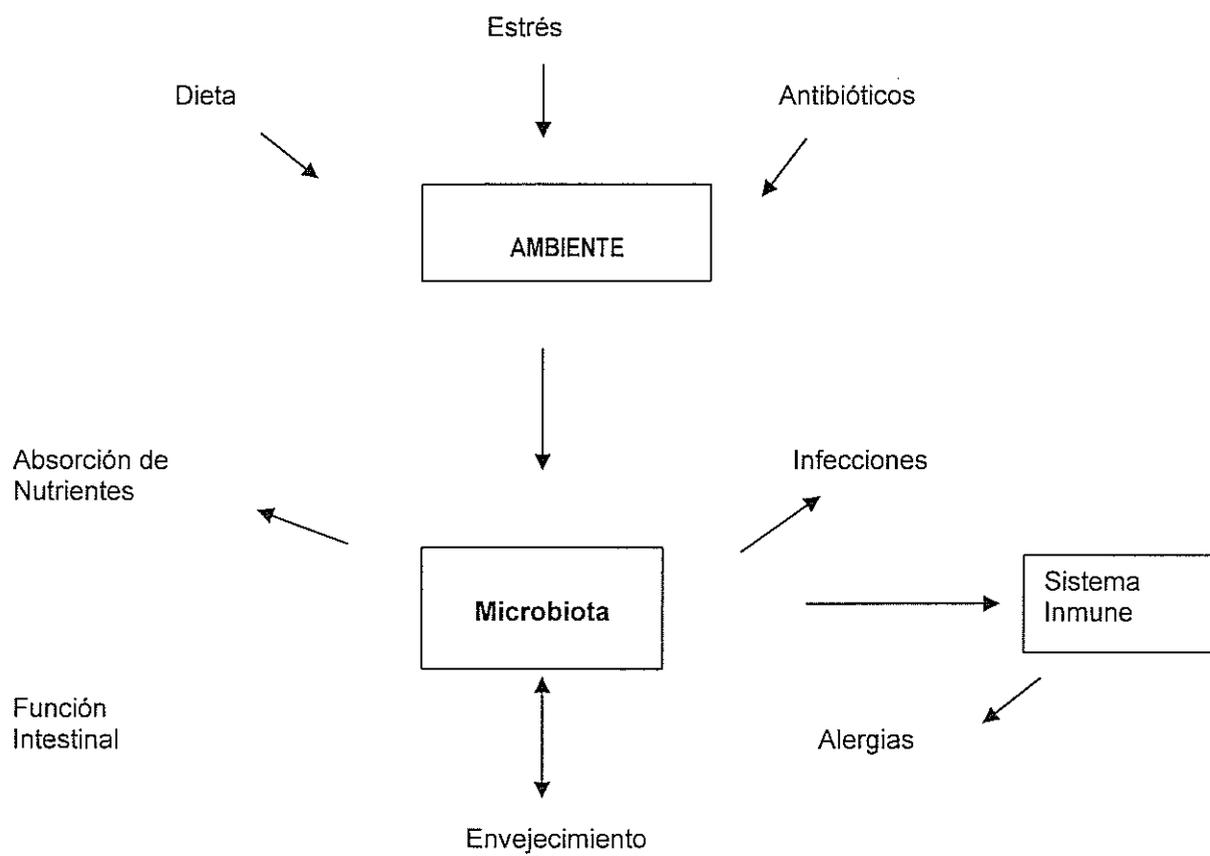


Figura 3. Sistema inmune y microbiota
Fuente. Diferentes lecturas.

2.6 Probióticos y suplementación

A continuación en la Figura 4 se resume las observaciones de la experiencia científica con respecto a la presencia de probióticos a nivel intestinal.

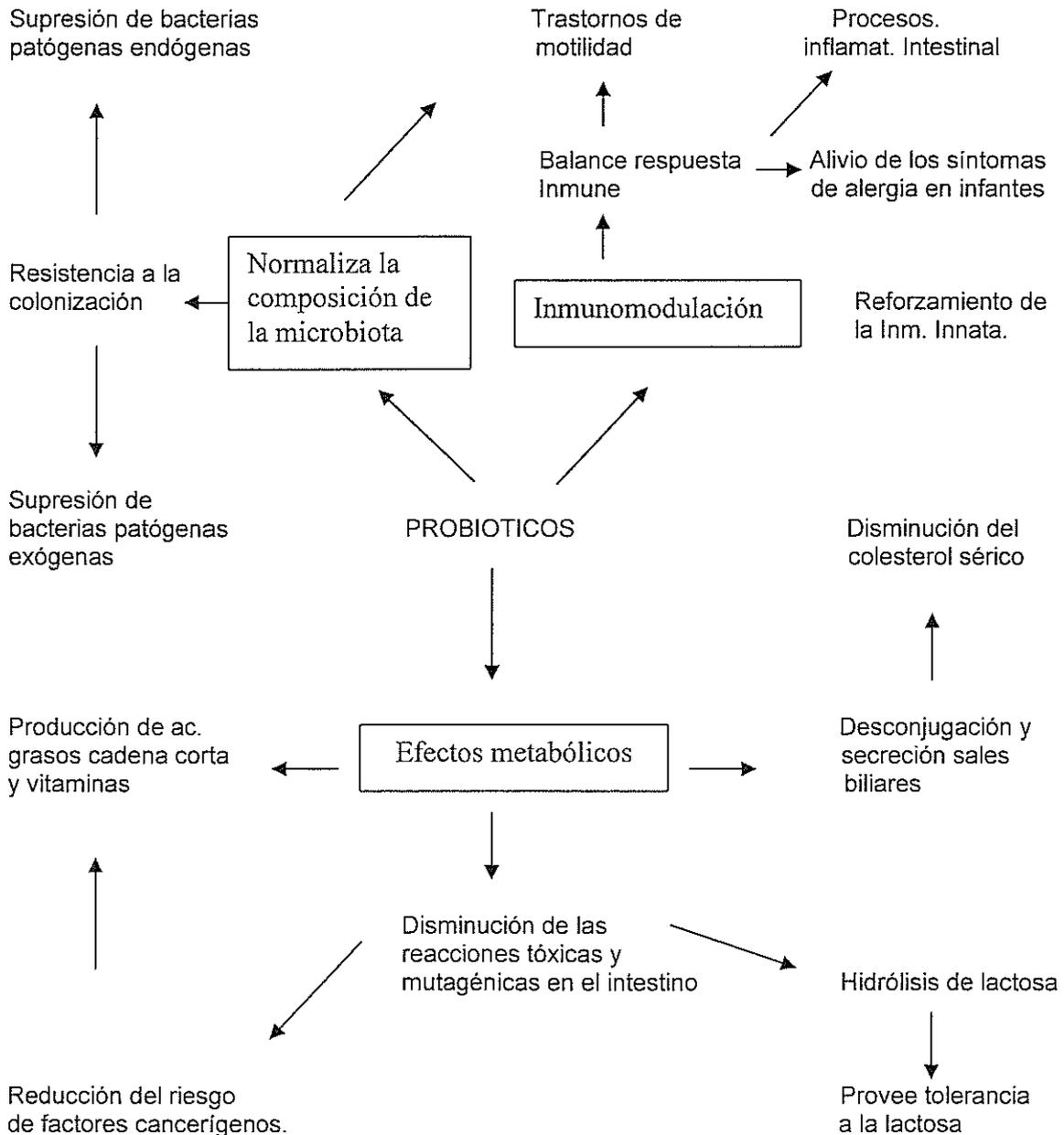


Figura 4. Consumo de Probióticos: Beneficios para la salud.

Los probióticos son cultivos bacterianos vivos activos, que al ingerirlos se adhieren a la mucosa del intestino y evitan la proliferación de agentes nocivos.

El término fue utilizado como antónimo de antibiótico en 1965 por Lilley y Stillwell (2) como “sustancias” que favorecen el crecimiento de microorganismos, 20 años más tarde Fuller define probióticos como bacterias vivas que al ser suplementadas logran efectos beneficiosos para el huésped mediante la provisión de un balance en la microbiota del intestino.

Un probiótico es un microorganismo no patógeno resistente a la digestión normal, que llega al colon en forma viable, donde tiene un efecto promotor de la salud para el huésped (47, 54). La viabilidad del probiótico es importante para ejercer sus funciones de bloqueo de toxinas y antisecretora (46).

Se ha utilizado bacterias en la industria de alimentos en preparados como el yogurt, y otros alimentos fermentados; en diversos países se emplean en panificación, cereales de desayuno, preparación de frutas, productos dietéticos, cárnicos, chocolates, aderezos, y quesos (46). Son considerados como aditivos para mejorar las características organolépticas dentro del proceso de elaboración, no necesariamente se han adicionado pensando en lograr algún beneficio extra para el consumidor.

La medicina de animales, lleva mucho tiempo investigando el uso de probióticos para prevenir enfermedades.

El término probiótico no está reconocido legalmente en muchos países y algunos de los términos con que se los conoce son: alimento, alimento funcional, alimento novedoso, remedio natural (Dinamarca, Suecia y Finlandia) producto natural saludable (Canadá), alimento dietético (Italia), suplemento dietario (Estados Unidos) o agente bioterapéutico y farmacéutico, no hay una definición oficial en la regulación Japonesa, pero se los conoce dentro de los productos FOSHU (Foods for Specialized Health Use) (45).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) se encuentran elaborando guías para el uso del término probiótico de manera que pueda incluirse en el Codex Alimentarius de manera adecuada, por lo pronto se sugiere cambiar el término “saludable” por “fisiológico” logrando la frase “efecto fisiológico beneficioso” para sustituir la frase “efecto beneficioso para la salud” (45).

El cuerpo humano aloja bacterias en los diferentes tejidos así: piel, pulmón e intestino, en número mayor que las propias células. Al momento aún se desconoce “las leyes” que rigen los microambientes para lograr el grado de mutualismo que mantiene inactivo los mecanismos de defensa del huésped frente a estas células procariotas. Para que un probiótico sea ideal debe sobrevivir al tracto gastrointestinal, llegar intacto al intestino, tener la propiedad de adherencia al epitelio y ser inocuo (45).

La mayoría de probióticos utilizados en la práctica son bacterias ácido lácticas, las mismas que están normalmente en porcentaje elevado en el intestino, las bacterias ácido lácticas están en el intestino delgado y en el colon (45); las bacterias más utilizadas en estudios como probióticos son *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Eubacterium* (17).

Es complicado evaluar la eficacia de los alimentos funcionales en el intestino mediante métodos actuales y además porque los factores que modifican esta modulación son múltiples y difíciles de controlar experimentalmente.

2.6.1 Características importantes de viabilidad de los probióticos

El uso de probióticos se difundió siglos atrás y fue destacado por el científico Elie Metchnikoff quien atribuyó a la leche fermentada la cualidad de prolongar la vida de ciertos grupos étnicos que los consumían (47).

Los probióticos no colonizan permanentemente el intestino, se deben consumir en cantidades suficientes y continuas (*mayor a 10^{10} ufc / día*) para mantenerse en cantidades adecuadas en el colon. (Conferencia Profesor José Saavedra seminario dictado en mayo, 2005 Quito - Ecuador).

La dosis utilizadas para lograr efectos fisiológicos en diferentes estudios se observaron con dosis de 10^8 a 10^{10} ; Saavedra administró dosis de 4.0×10^8 ufc al día obteniendo resultados clínicos (2); Guandalini (16) utilizó una dosis máxima de 3×10^{10} ufc /d como tratamiento en pacientes con diarrea, logrando disminuir el tiempo de recuperación; Hoyos (51) usó 2.5×10^7 ufc en tratamiento preventivo de enterocolitis necrotizante.

Sin embargo depende cuan estable es el probiótico en la presentación y esto a su vez depende de los diferentes factores que aparecen desde su consumo hasta que se ubican en el intestino (45).

La adición de probióticos a un alimento lo transforma en un alimento funcional que tiene al menos un efecto positivo para el hospedador además de su valor nutricional normal (13, 46).

Existen cuatro formas de hacer un alimento funcional:

- Eliminando un componente por ejemplo un alérgeno.
- Substituyendo un componente por ejemplo reemplazar grasa por fécula.
- Aumentando un componente por ejemplo vitaminas
- Agregando un componente que tenga efectos positivos conocidos para promover la salud por ejemplo la adición de una bacteria viable que es un probiótico, capaz de promover la salud (46).

Cuando se requiera seleccionar un probiótico, con el fin de incorporarlo a un alimento, se deben tomar en cuenta los siguientes puntos: (47)

- Cultivo bacteriano seguro.
- Costo asequible.
- Estable cuando se encuentre liofilizado.
- Ser de fácil uso.
- Tolerar las condiciones fisicoquímicas del alimento.
- Tolerar el proceso de transformación y conservación del alimento.
- Capacidad de llevar a cabo su efecto probiótico una vez que se encuentre en el intestino del huésped, gracias a su capacidad de adhesión.

Actualmente las especies de probióticos se reconocen en base a la secuencia de nucleótidos de su ARN o ADN obtenidos luego de un análisis molecular DNA-DNA hibridación específicamente de la región 16S rDNA y tests de fenotipo como fermentación de azúcares (45).

Hasta el encuentro realizado en mayo 2002 por ISAPP (Internacional Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) se conocían los genomas de 2 especies de probióticos: *Bifidobacterium longum* y *L. plantarum* y estaban en estudio los genomas de 8 especies: *L. johnsonii*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *B. longum* (una segunda especie) y *Bifidobacterium breve* (45).

Conocer la secuencia genómica sirve para obtener información sobre el metabolismo bacteriano, la fisiología de las bacterias en su interacción con el intestino, la bioseguridad en el consumo de estas bacterias.

Además se pueden estudiar otras características de las bacterias como el grado de tolerancia al ácido gástrico, líquido biliar, al estrés; los genes que codifican sus productos como polisacáridos, bacteriocinas; como funciona durante el metabolismo de carbohidratos, los genes que favorecen la cualidad de adherencia, los factores de virulencia, la inmunomodulación, y la resistencia a antibióticos (45).

En el futuro el reconocimiento de todas las bacterias deberá realizarse por sus genomas. La **FAO** y **OMS** recomiendan estudios doble ciego, randomizados placebo-control en fase 2 o su equivalente para inferir sobre los beneficios fisiológicos de los probióticos (45).

2.6.2 Mecanismos de acción de los probióticos en el intestino

Los mecanismos de modulación de la inmunidad que se nombran se obtuvieron de trabajos experimentales en modelos animales, proporcionarían un balance entre los probióticos y las enterobacterias. (Ver Figura 5).

- Producción de sustancias, con las cuales mata o inhibe a las bacterias patógenas.
- Competencia por los sitios de adhesión en el intestino y por las fuentes de nutrientes
- Inhibición de la producción o de la acción de las toxinas bacterianas (3, 54).
- *Bifidobacterium* produce un peptidoglicano que induce inmunopotenciación o estimulación de la inmunidad innata en una amplia variedad de huéspedes (3).
- Mack (16) demostró con estudios *in vitro* que los probióticos pueden reforzar la expresión del RNA mensajero de dos mucinas MUC 2 y MUC 3 estas glicoproteínas tienen un rol protector frente a las infecciones virales intestinales (16)
- Función inmunomoduladora por el contacto directo de las bacterias o de sus productos bacterianos (paredes celulares, o componentes citoplasmáticos) con células inmunes del intestino o por la producción de ácidos grasos de cadena corta obtenidos de la fermentación.
- Estimulación de la producción de inmunoglobulina A (48)
- Interacción con el epitelio intestinal, resultando en mecanismos de inmunidad contra bacterias patógenas

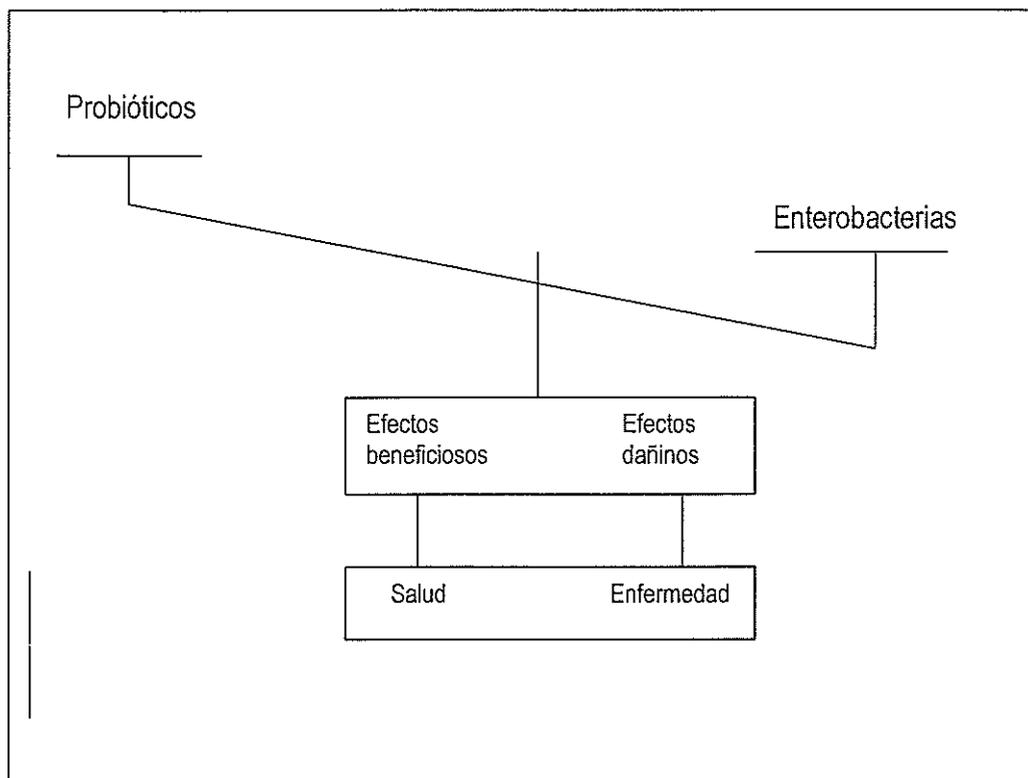


Figura 5. Balance entre la microbiota y las enterobacterias
Fuente Autora

2.6.3 Beneficios del consumo de probióticos

Se discute actualmente la participación de los probióticos en funciones intestinales relacionadas con el balance energético y modulación de la inmunidad.

Con respecto al balance energético la microbiota del intestino contribuye al almacenamiento de energía, se observó que ratones de laboratorio CONV-R (“conventionally raised”) presentaron 40% más de grasa corporal que los ratones GF (“germen free”), por hipertrofia de los adipositos y no por aumento del número de células. Las razones que explican este fenómeno son: las bacterias pueden recuperar energía de la digestión de los polisacáridos, a los cuales el hospedador no tiene acceso, además hay aumento de glucosa intestinal y circulante por ende de insulina; estimulando a nivel hepático la lipogénesis, e incremento de los ácidos grasos de cadena corta que también estimulan lipogénesis (5).

Otro mecanismo que participa en el balance es que la microbiota suprime la expresión epitelial intestinal del factor Fiaf (“fasting induced adipose factor”) o angiopoietin-like

protein 4, que es un Inhibidor de LPL (lipoproteinlipasa), entonces los triglicéridos que salen del hígado hacia el tejido adiposo son captados por el aumento de LPL (4, 49). Se observó también la estimulación de la producción de colipasa, que interviene en el metabolismo de los lípidos al estimular a las lipasas pancreáticas. La colipasa es producida por las células acinares pancreáticas, pero tiene expresión en las criptas epiteliales del ileón (49).

Sin embargo todos estos mecanismos dependen de las características propias de la microbiota y de la eficiencia de estas transformaciones, llamándose eficiencia al diferente grado de recuperación de energía y al potencial de almacenamiento de energía que caracterice a esta microbiota en relación a la dieta ingerida, y hay gran influencia del genotipo del hospedador, por tanto queda todavía investigar más ampliamente estos fenómenos para concluir acerca de balance energético y microbiota (4).

Hay estudios que sugieren otros efectos no inmunes de la microbiota del intestino como fortalecimiento de las uniones intercelulares (“tight junctions”), incremento de las secreciones mucosas, reforzamiento de la motilidad intestinal y producción de aminoácidos como arginina, glutamina y producción de ácidos grasos de cadena corta que secundariamente tienen una función nutritiva y protectora en el enterocito (13).

Los probióticos pueden disminuir los niveles de colesterol, e indirectamente disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular (45).

Con respecto a la inunomodulación se ha observado el incremento de la expresión de receptores poliméricos de inmunoglobulina “piar” que transporta IgA desde la lámina propia al epitelio (49), consecuentemente incremento del transporte de inmunoglobulina A. Los animales de laboratorio libres de gérmenes son más susceptibles a las infecciones, los animales con colonización bacteriana presentan expresión de genes involucrados en la absorción de nutrientes y defensa de la mucosa, destacándose el efecto protector de la microbiota.

Fisiológicamente existen mecanismos que permite reconocer los antígenos bacterianos estos activan los “toll-like receptors” que se encuentra en la superficie apical de las células epiteliales, además existen factores específicos como el “ NF-kB (es el mayor responsable de la respuesta inflamatoria de el intestino) que se activa al ponerse en contacto con los lipopolisacáridos (productos bacterianos) y luego activa la cascada

inflamatoria; Neish (50) quien describe este factor *in vitro* necesita confirmar *in vivo* la experiencia y debe identificar los productos bacterianos que participen de esta inhibición.

En estudios con animales gnotobióticos, hay poco desarrollo del sistema inmune intestinal y mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas patológicas los mecanismos de invasión son ocupación del intestino, disminución de la inmunoglobulina A y estimulación de la liberación de citoquinas y la competencia intraluminal por los nutrientes (10).

Los principales prebióticos en uso son lactobacilos, bifidobacterias; otros géneros incluyen *Echerichia*, *Enterococcus*, *Bacillus*, y *Saccharomyces* usados en investigaciones clínicas con probada seguridad y tolerancia (45).

2.6.4 Seguridad y tolerancia de los probióticos

En teoría la suplementación de probióticos puede ser efectiva en sujetos con alto riesgo de ser colonizados por microorganismos indeseables o patógenos para la salud y probablemente cuando la leche materna no puede ser la alimentación exclusiva de los infantes. En humanos esas situaciones incluyen parto por cesárea, infantes prematuros, infantes a término sometidos a hospitalizaciones prolongadas con riesgo de infecciones nosocomiales y que pudieran tener resistencia antibiótica, situaciones de estrés, tratamiento con antibióticos, cuando se desean mecanismos para restablecer la microbiota autóctona (9, 40). Sin embargo debe considerarse que los probióticos pueden transformarse en patógenos oportunistas especialmente en hospedadores inmunodeprimidos (46), posiblemente por translocación y propiciar endocarditis bacteriana, septicemia o abscesos hepáticos.

En un estudio realizado por Saavedra en 2002 con infantes en centros de cuidado diario, por 7 meses, recibieron fórmulas con *Bifidobacteria* y *S.thermophilus* a una concentración de 10^7 ufc /g o 10^6 ufc/g respectivamente, los resultados fueron un crecimiento normal de los sujetos, ningún efecto adverso y una disminución en el 25% de las pañalitis con un consumo máximo de 4.0×10^8 (2).

En estudios con infantes Guandalini et al y Hoyos suplementaron probióticos y no reportaron ningún efecto adverso (16, 51).

Capítulo 3

Metodología.

3.1 Variables

3.1.1 Crecimiento y desarrollo

Se consideraron para análisis los datos antropométricos de peso/ edad, longitud/ edad y perímetro cefálico/ edad con registros mensuales para cada niño por 6 meses. (Ver cuadro 7).

Cuadro 7. Técnicas e instrumentos antropométricos		
VARIABLES	INSTRUMENTO	TÉCNICA
PERIMETRO CEFALICO	Cinta flexible, metálica (anchura de la cinta 0,5 cm).	Se medirá la circunferencia máxima, entre las prominencias frontal y occipital.
PESO	Una balanza para lactantes con graduaciones cada 10 gramos.	Sin ropa, se coloca al niño sobre la balanza y se efectúa la lectura hasta los 10 y 100 gramos completos.
LONGITUD CORPORAL	Un paidómetro en una superficie horizontal dura.	Con la ayuda de la madre, acostado sobre la superficie horizontal, estirar las piernas del niño, se desliza la superficie vertical móvil hasta hacer contacto con los talones del niño, y se mide.
Fuente Ref. (21)		

Los datos fueron obtenidos por una sola persona durante todo el seguimiento. Los datos se consideraron para el peso en kilogramos y gramos, para la longitud y perímetro cefálico en centímetros y milímetros.

3.1.2 Enfermedades infecciosas

También se consideró la variable infecciones clasificadas como infecciones respiratorias agudas e infecciones gastrointestinales agudas, mediante la observación y la información dada por las madres de los infantes durante los seis meses de seguimiento. Mediante criterio clínico se consideró si la infección era leve, moderada o grave. A continuación se encuentran las definiciones que se consideraron. (Ver Cuadro 8).

Cuadro 8. Identificación de las infecciones respiratorias agudas y las enfermedades diarreicas agudas	
INFECCIONES	CARACTERISTICAS QUE LAS DEFINEN
INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS (IRA):	Signos y síntomas respiratorios: Fiebre, congestión nasal, rinorrea amarilla o verde, tos seca o productiva, dificultad respiratoria, hiporexia, deterioro del estado general. Duración de los signos y síntomas mayor a 3 días. Se evaluarán como leves, moderadas y graves dependiente del estado general del niño. LEVES y MODERADAS que necesitaron tratamientos ambulatorios y las GRAVES tratamiento en hospital.
ENFERMEDADES DIARREICAS AGUDAS (EDA):	Signos y síntomas gastrointestinales: Fiebre, dolor abdominal, diarrea (aumento de la frecuencia de evacuaciones en un día, incluso aquella que tienen moco y sangre), vòmito, hiporexia, deterioro del estado general. Se evaluarán como leves, moderadas y graves dependiente del estado general del niño. LEVES y MODERADAS que necesitaron tratamientos ambulatorios y las GRAVES tratamiento en hospital.
Elaborada por la autora.	

3.1.3 Tratamientos dietéticos

La variable dieta o tratamientos dietéticos fueron establecidas previamente como se indica en el cuadro. Distribuidos en tres diferentes grupos, cada grupo con 5 sujetos; cada madre recibió la información respectiva para entregar a sus hijos los alimentos complementarios y las fórmulas infantiles en el caso de los grupos 2 y 3. (Ver Cuadro 9)

Cuadro 9. Tipos de dietas para los grupos del estudio	
TIPOS DE DIETA	CARACTERISTICAS
DIETA PARA GRUPO 1	Alimentos complementarios + Fórmula infantil que contiene Probióticos
DIETA PARA GRUPO 2	Alimentos complementarios + Formula infantil sin probióticos.
DIETA PARA GRUPO 3	Alimentos complementarios solos.
Elaborada por la autora.	

3.1.4 Composición de la microbiota

La composición bacteriana se definió como una variable cualitativa, los resultados del análisis de la composición de la microbiota infantil se obtuvieron al final de los seis meses de tratamiento con las diferentes dietas, puesto que las 45 muestras fueron procesadas en dos lugares.

En el laboratorio de la Universidad San Francisco de Quito se recolectaron las muestras, se almacenaron y se realizó el aislamiento del DNA y en una segunda fase en la Universidad de Illinois- Estados Unidos, se realizó PCR y DGGE con identificación de la secuencias

genéticas y análisis computarizado mediante algoritmos para observar si había diferencias de las secuencias entre grupos y entre las muestras tomadas al inicio, luego del primero y sexto mes del consumo de fórmulas y alimentos complementarios.

La primera fase la realizó la investigadora - autora de la tesis, y la segunda fue realizada por docentes de la Universidad San Francisco de Quito y docentes de la Universidad de Illinois, que siempre desconocieron a que grupo pertenecían las muestras, el análisis de las muestras de los grupos se hizo en forma ciega, cada niño fue identificado con un código numérico.

3.2 Diseño del estudio

Es un estudio prospectivo randomizado, doble ciego con grupo control.

Ciego para los cuidadores de los infantes y para el análisis de las muestras de heces en el laboratorio (Universidad de Illinois – Estados Unidos); el seguimiento clínico no fue ciego para la investigadora, por ser quien debía distribuir las fórmulas durante la investigación y realizar el seguimiento clínico.

3.3 Comité de ética

Se obtuvo el consentimiento escrito de las madres de los infantes, el seguimiento clínico fue de 7 meses. El tema del proyecto fue aprobado por el docente tutor y puesto en consideración al comité de ética de la Universidad San Francisco de Quito, quienes también aprobaron el proyecto para llevarlo a cabo. La Fundación Children Internacional AOA Quito autorizó la elaboración del proyecto con las familias de los patrocinados.

3.4 Sujetos

Se obtuvo una lista de 97 familias y sus miembros menores de un año, de los cuales 60 correspondían a la edad de selección (6 o 7 meses de edad); participaron 15 sujetos que cumplieron con los criterios de selección preestablecidos. Los niños fueron seleccionados aleatoriamente, mediante muestreo sin reemplazo, utilizando la tabla de números aleatorios. Los criterios de inclusión fueron recibir leche materna exclusiva desde el nacimiento hasta el momento de la selección, nacimiento por parto normal, no presentar enfermedades graves o crónicas, no haber tenido peso bajo al nacer, y vacunación

completa para la edad más cumplimiento de la asistencia al control de “Niño Sano” del programa de atención a menores de un año del Ministerio de Salud Pública del Ecuador.

3.5 Suplementación

Las fórmulas infantiles fueron entregadas por la empresa Nestlé Quito – Ecuador; las dos fórmulas del estudio son productos de venta al público.

La información nutricional de las fórmulas es la siguiente 3.3 gramos de proteína; 4.4 gramos de grasa; 11.8 gramos de carbohidratos en 100 kilocalorías.

Los ingredientes de las fórmulas son: caseína, aceite vegetal, maltodextrina, lactosa, vitaminas y minerales suplementadas de acuerdo a la FDA (Food and Drug Administration). (Ver Anexo 1 Información nutricional de las fórmulas).

La fórmula sin probióticos contiene la base nutritiva solamente y la fórmula con probióticos contiene adicionalmente 10^7 unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de polvo de la bacteria *Bifidobacterium lactis* y 10^6 ufc/g de polvo de fórmula de la bacteria *Streptococcus thermophilus*; la apariencia y olor de las dos fórmulas fueron semejantes; las fórmulas fueron preparadas en agua de acuerdo a las instrucciones del producto.

Las recomendaciones a los tres grupos en alimentación fue seguir con leche materna a demanda espontánea y adicionalmente en los grupos 1 y 2 consumo de la fórmula preparada bajo las instrucciones del producto.

Durante cada visita se retroalimentaba a la madre la forma de preparación y se registró el consumo de la fórmula. Por cada onza de agua hervida se utilizó una medida de la fórmula en polvo se consideró un consumo inicial de 3 onzas hasta completar aproximadamente las 20 onzas diarias en los dos grupos, se media la preparación en las botellas para uso infantil pero siempre la sugerencia es que se usara la taza y la cuchara para la administración de la fórmula; la madre registraba la cantidad consumida igualmente en onzas en una libreta que la llevaba a cada control.

Además se mantenía comunicación por teléfono para el seguimiento y el reporte de problemas de salud y novedades en la preparación de las fórmulas de los infantes.

3.6 Seguimiento clínico: evaluación nutricional, desarrollo psicomotor y registro de infecciones

Para la evaluación nutricional se utilizó las curvas de crecimiento infantil de 0 a 36 meses para peso - edad, talla - edad y perímetro cefálico - edad del Center for Chronic Disease (CDC) (Revisadas Noviembre 2000, <http://www.cdc.gov/growthcharts>). (Ver Anexo 2 curvas de crecimiento infantil).

Para la evaluación del desarrollo psicomotor se aplicó el test “Denver” “Examen del Desarrollo del niño” (MSP. H.C.U Form 028-C/92- Atención Infantil, Pre-escolar y Escolar). (Ver Anexo 3 Test Denver).

El registro de las infecciones según la gravedad del episodio, se realizó en las historias clínicas y luego se contabilizaron y clasificaron al final de la investigación.

3.7 Recolección de las muestras de heces

Se adiestró a las madres sobre como recoger la muestra de heces, para llevarla a la consulta tratando que no sobrepase las dos horas posterior a la evacuación, la mayoría de madres recogió cantidades suficientes de muestra para su procesamiento, quienes no lo hicieron la toma de la muestra se repitió.

Se recolectaron las muestras de heces al inicio del estudio, luego del primero y sexto mes posterior al consumo de las fórmulas y alimentos complementarios; se transportaron en termos desde el consultorio al laboratorio de la Universidad, se mantuvieron congeladas a menos 20°C hasta el momento del procesamiento.

3.8 Análisis microbiológico de la fórmula con probióticos

Se analizó la viabilidad de *B Lactis BL* y *S thermophilus* en la fórmula con prebióticos; se tomó inicialmente 1 gramo de la fórmula diluido en 10 ml de un medio de tioglicolato y se cultivó en medios de cultivo aerobio y anaerobio.

Se tomó 10 ul del caldo se hizo la siembra en agar rafinosa - *Bifidobacterium*, un medio selectivo para bifidobacterias (57) y 10 ul en agar *S thermophilus* un medio selectivo para *S thermophilus* (58).

En función de determinar el enriquecimiento con *B Lactis* y *S thermophilus* en heces de niños que tomaron fórmula con probióticos, se llevó a cabo PCR con “primers” específicos para las dos bacterias, las secuencias de los mismos detallados a continuación.

PCR primers for *B. lactis BL*:

Blac F: 5'- CCC TTT CCA CGG GTC CC -3'

Blac R: 5'-AAG GGA AAC CGT GTC TCC AC-3'

PCR primers for *S. thermophilus*

Sth F: 5'- ACG GAA TGT ACT TGA GTT TC -3'

Sth R: 5'- TTT GGC CTT TCG ACC TAA -3'C

3.9 Aislamiento de DNA

El DNA genómico de las 45 muestras de heces fue extraído usando Ultra Clean Fecal DNA Simple Kit, de acuerdo a las recomendaciones de manufactura MO BIO Laboratories, Inc.

Las muestras de heces recolectadas antes de la suplementación con fórmula, luego del primer mes y del sexto mes de la introducción de la fórmula.

Durante el aislamiento del DNA se utilizó aproximadamente 0,25 gramos de heces del cual se aisló 1 ng /ul de DNA.

El DNA bacteriano aislado fue sometido a PCR y luego DGGE, luego se analizaron los geles para la identificación de las bandas obtenidas, los datos de las secuencias fueron analizados usando a BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) investigado para la identificación filogenético de las bacterias.

3.10 Técnica de la reacción en cadena de polimerasa

Se usó para la amplificación de la región 16S rDNA de las bacterias de las heces de los infantes de los grupos 1, 2 y 3 “primers” universales cuyas secuencias son las siguientes:

Universal 16sDNA V3

16SV3F: 5'- CCT ACG GGA GGC AGC AG -3'

16SV3F + GC Clamp: 5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG
GCACGG GGG GCC TACGGG AGGCAG CAG -3'

Se realizó qPCR (“qualitative real time PCR”) para enumerar las bacterias que no fueron detectadas fácilmente por PCR-DGGE y para las bacterias probióticas.

Inicialmente se corrieron en qPCR concentraciones que se fueron incrementando progresivamente de menos 2ng a 10 ng de DNA. De todas las muestras de heces se determinó curvas estándar con concentraciones para una línea de base respectivamente.

3.11 Determinación de DGGE (Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización)

Es una técnica en “fingerprinting”, que permite el análisis rápido de la diversidad bacteriana dentro de un ecosistema.

El principio del DGGE se basa en el hecho de que las dos hebras DNA se disocian a temperaturas altas, o bajo la influencia de químicos desnaturalizantes.

Cuando se analiza por DGGE, se colocan las muestras de DNA (segmentos amplificados “amplicons” de PCR del gen 16S rDNA) encima de un gel de poliacrilamida que contiene compuestos desnaturalizantes cuya concentración es lineal en el gel. En seguida, se pone el gel en un campo eléctrico. Durante la electroforesis el DNA está emigrando al extremo eléctricamente positivo (al fondo del gel) y se va disociando; el DNA siempre comenzará a fundirse fuera de un extremo, porque el PCR usa un fijador de GC. El fijador consiste en 40 nucleótidos – con Gs y Cs – y por eso es muy difícil que se funda fuera (la disociación de de tres puentes de hidrógenos en el par de base G –C requiere más energía que disociar dos puentes de hidrógeno en el par de base A-T); así se evita la disociación del producto entero de PCR. Cuando se disocia el DNA pierde movilidad por el cambio de estructura geométrica y al alcanzar una cierta concentración de compuestos desnaturalizados se detiene. La concentración de compuestos desnaturalizados a la cual una muestra de DNA parará de emigrar, depende de la secuencia del producto de PCR; cuantos más Gs y Cs hay en un producto de PCR, lo más alto será el porcentaje de químicos desnaturalizantes que se

necesitan para fundir el producto. Después de “manchar”, una banda aparecerá en la posición en el gel donde un producto de PCR haya parado la migración (62).

Por DGGE es posible separar las secuencias con solamente un par de bases de diferencia sobre el gel; el principio de la técnica de DGGE es presentado en la Figura 6.

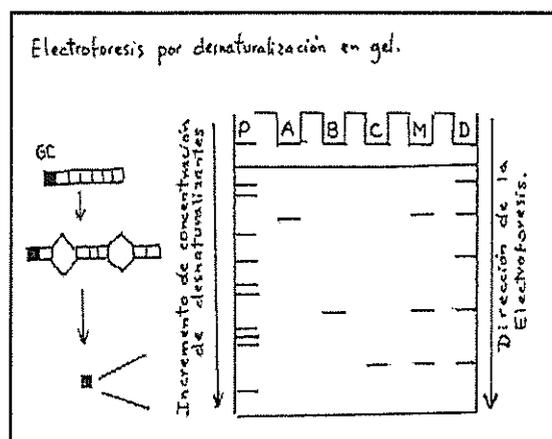


Figura 6. Principio de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización

Fuente Ref.(62)

Para separar los productos del PCR se preparó un gel desnaturalizante, gel de poliacrilamida al 8% con más o menos 35-60% linear DNA de gradiente de desnaturalización. (100 % desnaturalizante es equivalente a 7 mol /L de urea y 40% de formamide desionizada).

La electroforesis se corrió a 150 V por 2 horas a 60 grados centígrados, luego por 1 hora a 200V como marcadores se usaron “bandas” de bacterias conocidas, que se corrieron para estandarizar la migración de bandas en geles diferentes. Después de la electroforesis, los geles fueron tinturados con plata y escaneados en un GS-710 “calibrated imaging densitometer” (Gibco). Las bandas obtenidas después de DGGE fueron analizadas con el algoritmo de Ward (60).

Capítulo 4

Análisis de Datos.

4.1 Resultados del estado nutricional y desarrollo psicomotor

Todos los niños de los grupos 1, 2 y 3 tuvieron un chequeo clínico y una evaluación nutricional mensual; el grupo 1 que recibió suplementación de fórmula con probióticos, el grupo 2 que recibió suplementación de fórmula sin probióticos y el grupo 3 que recibió solo alimentos complementarios.

Al inicio del estudio como se puede observar en la Tabla 1 los tres grupos compartían características semejantes entre sí.

Tabla 1. Características generales de los niños y duración de la suplementación				
	Total N° Niños (n = 15)	Fórmula con probióticos (n=5)	Fórmula sin prebióticos (n = 5)	Alimentos regulares (n = 5)
1. Género M/F	6 / 9	2 / 3	1 / 4	3 / 2
2. Edad al inicio del proyecto +/- DE	7m 10ds +/- 21 ds	7m 18 ds +/- 7 ds	7 m 6 ds +/- 25 ds	7m 6 ds +/- 25 ds
3. Edad al final del proyecto +/- DE	13m 10 ds +/- 21 ds	13m 17 ds +/- 16 ds	13m 6 ds +/- 25 ds	13m 6 ds +/- 25 ds
4. Duración del estudio en días (rango)	180 – 190 ds	180 ds	190 ds	182 ds
Fuente Datos de la investigación				
M= masculino; F= femenino; DE= desviación estándar; m= meses; ds= días				

Se analizó mediante la prueba de hipótesis y se aplicó la prueba F que compara medias entre grupos a los incrementos de peso, longitud y perímetro cefálico en los tres grupos.

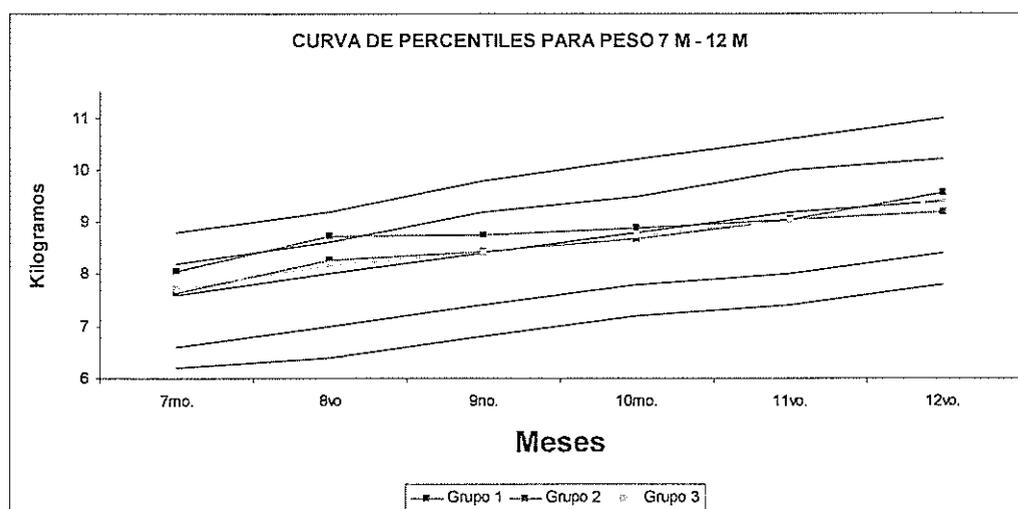
La diferencia obtenida no fue de significancia estadística, es decir que no hubo diferencia entre las ganancias de peso, longitud y perímetro cefálico para ninguno de los tratamientos establecidos. Tabla 2

Tabla 2. Datos de crecimiento para todos los niños del estudio. Ganancia total en peso, longitud y perímetro cefálico									
DATOS	FORMULA CON PROBIOTICOS			FORMULA SIN PROBIOTICOS			ALIMENTOS REGULARES		
	I	F	G	I	F	G	I	F	G
PESO (KG)	8.06 +/- 0.51	9.56 +/- 1.06	1.5	7.64 +/- 0.39	9.18 +/-1.0	1.5	7.72 +/- 0.42	9.42 +/- 0.94	1.7
TALLA (CM)	68.14	72.24	6.1	65.54	70.68	5.8	65.1	71.0	5.9
P. CEF (CM)	43.52	46.66	3.1	42.94	46.34	3.4	43.4	46.14	2.7

Fuente Datos de la investigación
I= al inicio del estudio, F= al final del estudio, G= Ganancia total

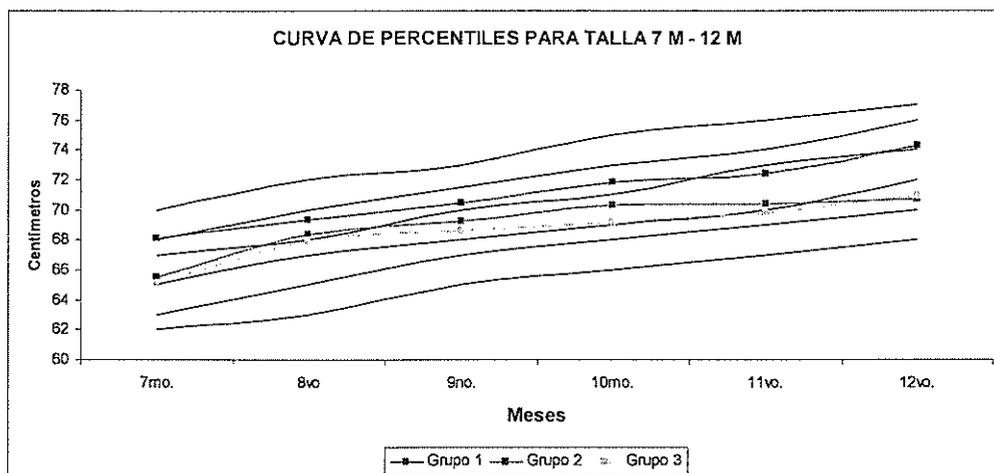
Se pudo observar en todos los casos un aplanamiento de la línea de crecimiento en la longitud y en el peso, no en el perímetro cefálico, siempre el grupo 1 mantuvo pesos, y longitudes mayores desde el inicio, seguido por el grupo 3 y por el grupo 2. Sin embargo el comportamiento graficado en la curva es similar para los tres grupos, no llegaron a ubicarse por debajo de -2DS en cuyo caso el diagnóstico es desnutrición global, crónica o aguda, según las consideraciones de la Organización Mundial de la Salud. (Ver Figuras 7, 8, 9).

Figura 7. Curva de seguimiento de peso de los niños y niñas del estudio



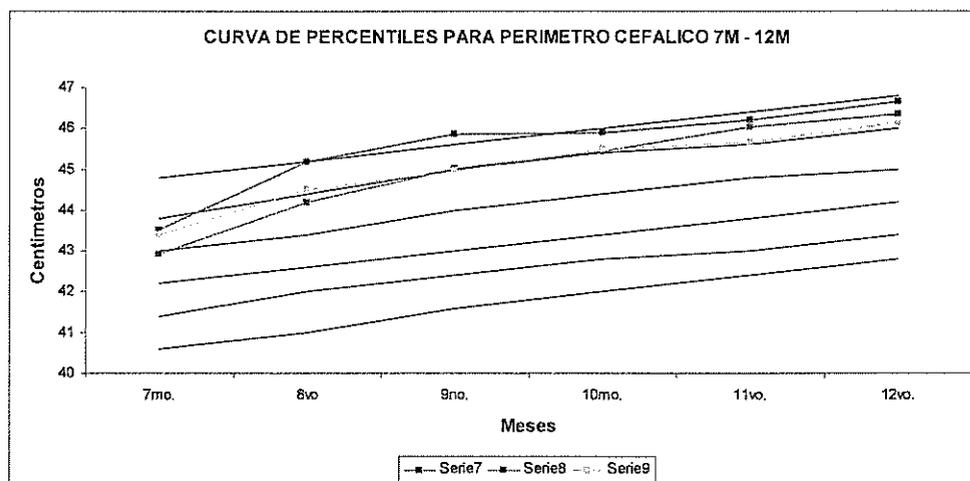
Grupo 1= Fórmula más probióticos; grupo 2= Fórmula; Grupo 3= Solo alimentos complementarios.
Elaborado : Autora.

Figura 8. Curva de seguimiento de longitud de los niños y niñas del estudio



Grupo 1= Fórmula más probióticos; grupo 2= Fórmula; Grupo 3= Solo alimentos complementarios.
Elaborado : Autora.

Figura 9. Curva de seguimiento de perímetro cefálico de los niños y niñas del estudio



Grupo 1= Fórmula más probióticos; grupo 2= Fórmula; Grupo 3= Solo alimentos complementarios.
Elaborado : Autora.

En el Anexo 4 (puntajes z) se presentan los datos de peso, longitud y perímetro cefálico de cada niño de cada grupo durante los seis meses de estudio, transformados en puntajes z,

para observar el comportamiento en el crecimiento en relación a la desviación estándar de una curva de distribución normal.

En el estudio del Desarrollo Psicomotor con el test Denver no se encontró “ningún atraso” en la aplicación de la prueba a los niños y niñas. Este test valora las funciones motoras gruesas, funciones motoras finas, funciones sensoriales y funciones sociales, sin embargo no valora agudeza auditiva ni visual en detalle, no se utilizó ninguna técnica adicional.

Las cantidades de fórmula que se consumieron se encuentran en la Tabla 3.

	Promedio del volumen de consumo de fórmula - día	Promedio de kilocalorías consumidas - día
Grupo 1	671 ml +/- 104,6	450,33 kcal +/- 70,2
Grupo 2	651 ml +/- 189,4	436,91 kcal +/- 127
Fuente datos de la investigación.		

4.2 Resultados de la frecuencia de infecciones agudas

El número de episodios de Infecciones respiratorias agudas (IRA) en 12 meses en niños menores de un año de edad en la práctica pediátrica es de 5 a 7. El número de episodios de enfermedad diarreica aguda (EDA) en 12 meses menores de 5 años de edad en la práctica pediátrica es 3, y en algunas regiones de 6 a 8 por año. .

	INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS	DIARREAS AGUDAS	TOTAL N° DE CASOS
FORMULA CON PROBIOTICOS	8 (5L,2M,1G)	5 (4L,1M)	13
FORMULA SIN PROBIOTICOS	5 (1L, 4M)	4 (2L, 2M)	9
ALIMENTOS REGULARES	9 (5L, 3M, 1L)	5 (4L, 1M)	14
TOTAL	22	14	36
Fuente datos de la investigación L= Leve, M= Moderada, G= Grave			

Como se observa en la Tabla 4 la frecuencia de infecciones entre grupos fue similar; además que en seis meses de seguimiento todos los niños se encuentran dentro del promedio considerado de frecuencia de episodios de IRA (5 a 7 por año) y EDA (6 a 8 por año). Ningún niño sobrepasó el número de 3 episodios de IRA y ninguno tuvo más de 2 episodios de EDA en el transcurso de seis meses.

4.3 Resultados del análisis microbiológico de la fórmula con probióticos

La fórmula con probióticos sembrada en agares específicos - *Bifido bacterium*, un medio selectivo para bifidobacterias (57) y agar S agar “Raffinose Thermophilus” un medio selectivo para *S thermophilus* (58) dio como resultados colonias con formas típicas de *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* como se observa en las Figuras 10a y 10b.

Figura 10a. *Streptococcus thermophilus*

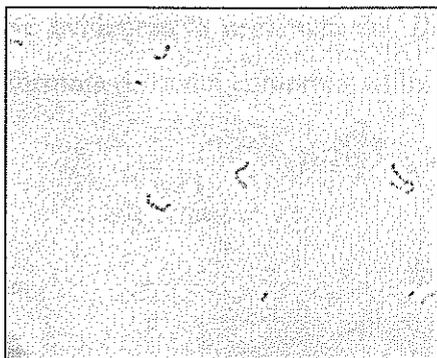


Figura 10b *Bifidobacterium lactis*



En la amplificación del DNA por PCR se utilizó:

- DNA de las bacterias de los agares específicos *Bifido bacterium*, un medio selectivo para bifidobacterias (57) y agar S agar Raffinose Thermophilus un medio selectivo para *S thermophilus* (58).
- DNA de bacterias previamente identificadas (Controles negativos). Figura 10
- DNA de cultivos puros de *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Gmb (DSMZ), Germany). (Control positivo)

Además del análisis por PCR con “primers” específicos para *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* se usó otro método el qPCR (59, 60, 61).

Se evidenció la presencia de *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* en la fórmula de venta comercial utilizada. Figura 11

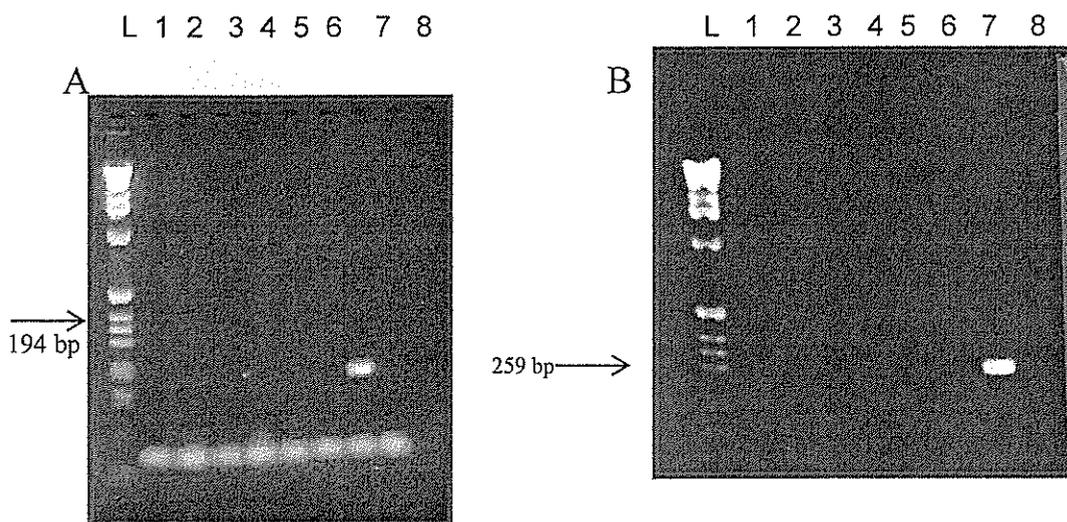


Figure 11. Productos de PCR de la región 16sDNA V3 de las bacterias aisladas de la fórmula con probióticos, comparados con productos de diferentes especies bacterianas.

A. Productos de PCR con primers específicos para *Bifidobacterium Lactis BL* y B. primers específicos para *Streptococcus Thermophilus*.

A. 1, *B. fragilis*; 2, *C. paratrificum*; 3, *E. rectale*; 4, *C. coccidioides*; 5, *B. Bifidum*; 6, *B. Adolescentis*; 7, *B. lactis*; 8, control negativo.

B. 1, *B. fragilis*; 2, *C. paratrificum*; 3, *E. rectale*; 4, *C. coccidioides*; 5, *B. Bifidum*; 6, *B. Adolescentis*; 7, *S. thermophilus*; 8, control negativo

L = Marcador DNA

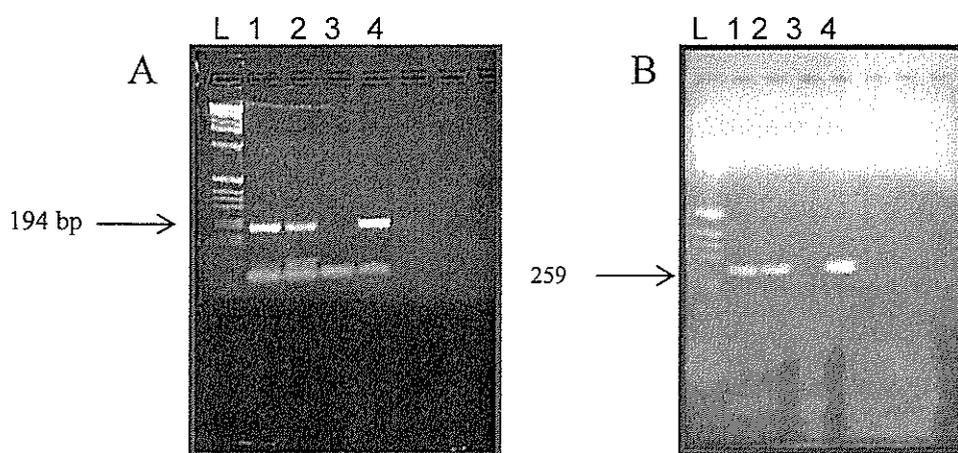


Figura 12. Productos de PCR de la región 16sDNA V3 de las bacterias aisladas de la fórmula con probióticos.

A. Muestra DNA aislada de un medio selectivo para *Bifidobacterium Lactis BL*.

B. Muestra DNA aislada de un medio selectivo para *Streptococcus Thermophilus*. 1 y 2 DNA de la fórmula con probióticos, 3 control negativo y 4 control positivo (cultivo puro de *B. Lactis BL* y *S. Thermophilus*, en A y B respectivamente). L = marcador de DNA

4.4 Resultados de la composición microbiana de las heces por PCR – DGGE

La composición bacteriana de heces de infantes suplementados con alimentos comunes, con fórmulas con probióticos (*B Lactis BL* y *S thermophilus*) y fórmulas sin probióticos se analizaron por PCR – DGGE. La Figura 13 muestra los productos de amplificación de 16sDNA región V3 del DNA fecal de muestras obtenidas al inicio, luego de un mes y luego de 6 meses de suplementación.

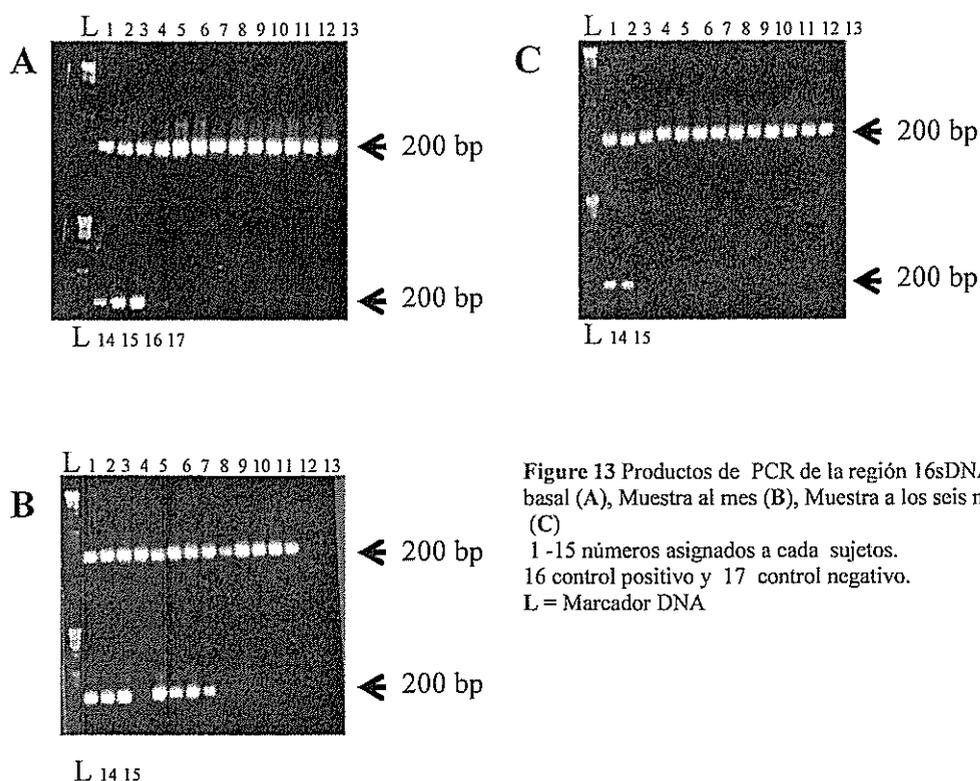


Figure 13 Productos de PCR de la región 16sDNA V3. Muestra basal (A), Muestra al mes (B), Muestra a los seis meses.

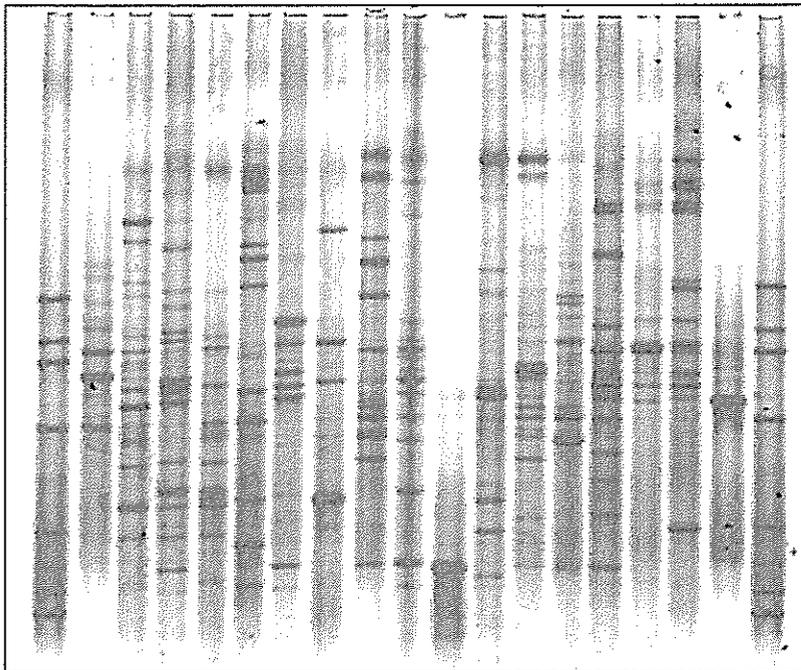
(C)
 1-15 números asignados a cada sujetos.
 16 control positivo y 17 control negativo.
 L = Marcador DNA

De los “primers” universales usados en estas primeras ampliaciones se obtuvo un producto de 200 pares de bases, en cada análisis.

Como indica la Figura 13 todas las muestras de los 3 grupos produjo productos; después de esta confirmación los productos iniciales del análisis de PCR fueron sometidos a DGGE.

Las Figuras 14, 15 y 16 muestran patrones de bandas típicas observadas después del DGGE, cada gel contenía las muestras de 5 niños y cada niño tenía 3 muestras de heces tomadas una al inicio de la suplementación (a) otra luego de 1 mes (b) y otra luego del sexto mes (c) de la suplementación con fórmula.

En las Figuras los códigos fueron designados al azar. Los códigos numéricos del **grupo 1** son : 5, 6, 13, 14, 15, del **grupo 2** son: 7, 8, 10, 11, 12 y del **grupo 3** son: 1, 2, 3, 4, 9.

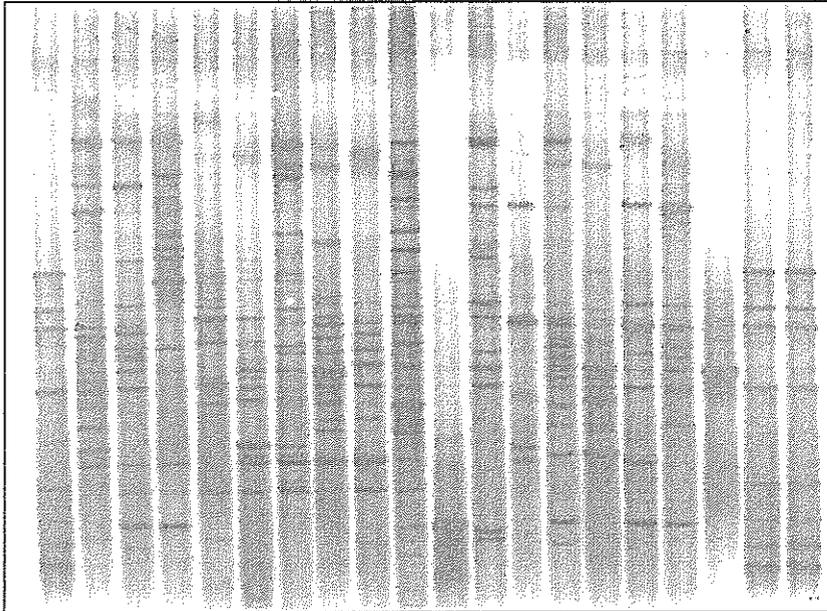


M a b c a b c a b c B a b c a b c S M
 1 2 3 4 5

Figure 14 Productos amplificados por DGGE al inicio, luego del primer mes y luego del sexto mes. Con probióticos (Grupo1), sin probióticos (Grupo2) y alimentos regulares (Grupo 3). 1 -5: número de identificación de los niños

a. Muestra Basal; b. Después de un mes c. Después de seis meses

M: marcador B: *B. lactis*; S: *S. thermophilus* G1: 5,6,13,14,15; G2: 7,8,10,11,12; G3: 1,2,3,4,9



M a b c a b c a b c B a b c a b c S M M
 6 7 8 9 10

Figure 15 Productos amplificados por DGGE al inicio, luego del primer mes y luego del sexto mes. Con probióticos (Grupo1), sin probióticos (Grupo2) y alimentos regulares (Grupo 3)

6- 10: número de identificación de los niños

a. Muestra Basal; b. Después de un mes c. Después de seis meses M: marcador B: *B. lactis*; S: *S. thermophilus* G1: 5,6,13,14,15; G2: 7,8,10,11,12; G3: 1,2,3,4,9

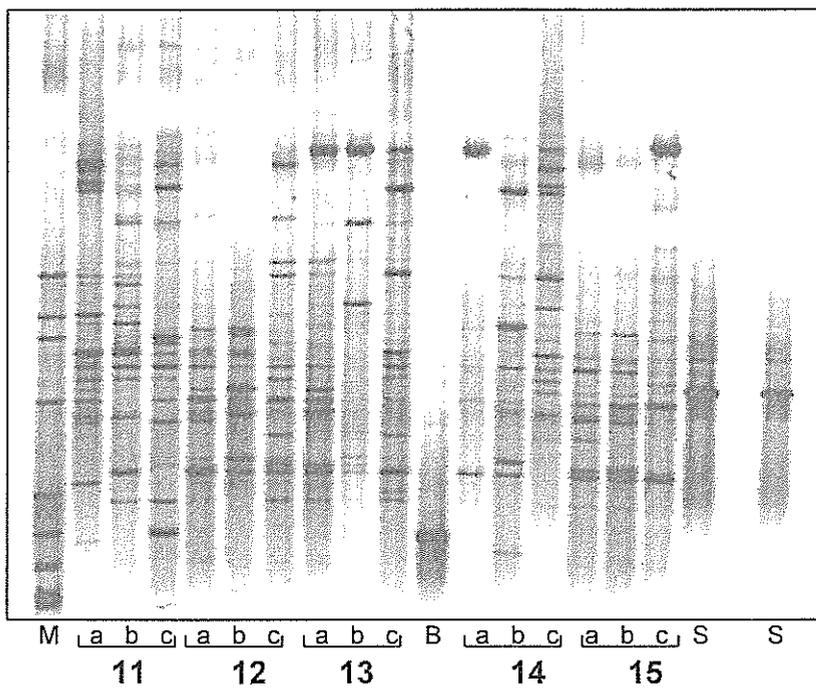


Figure 16 Productos amplificados por DGGE al inicio, luego del primer mes y luego del sexto mes. Con probióticos (Grupo1), sin probióticos (Grupo2) y alimentos regulares (Grupo 3)

11 - 15: número de identificación de los niños

a. Muestra Basal; b. Después de un mes c. Después de seis meses M: marcador B: *B. lactis*; S: *S. thermophilus*

G1: 5,6,13,14,15; G2: 7,8,10,11,12; G3: 1,2,3,4,9

Los efectos de la suplementación en la dieta, sobre el número de bandas expresadas en cada muestra fueron comparadas en PCR_DGGE.

El número de bandas en las muestras recolectadas al inicio del estudio fueron similares entre los 3 grupos, hubo incremento en la complejidad de la composición de la microbiota al primer mes y al sexto mes después de la suplementación, el número de bandas se incrementó en las muestras tomadas en el mes 1 y en el mes 6 después de iniciado el estudio. Los efectos de la dieta sobre la composición microbiana, fueron también evaluados por análisis “cluster” usando el algoritmo de Ward.

Las poblaciones microbianas de niños que recibieron fórmula sin probióticos o fórmula con probióticos fueron muy parecidos la una a la otra, en comparación con los niños suplementados con comida regular; esto fue más evidente después del primer mes de suplementación.

La Figura 17 muestra las diferencias encontradas entre los niños que recibieron alimentos regulares y los dos grupos que recibieron fórmulas.

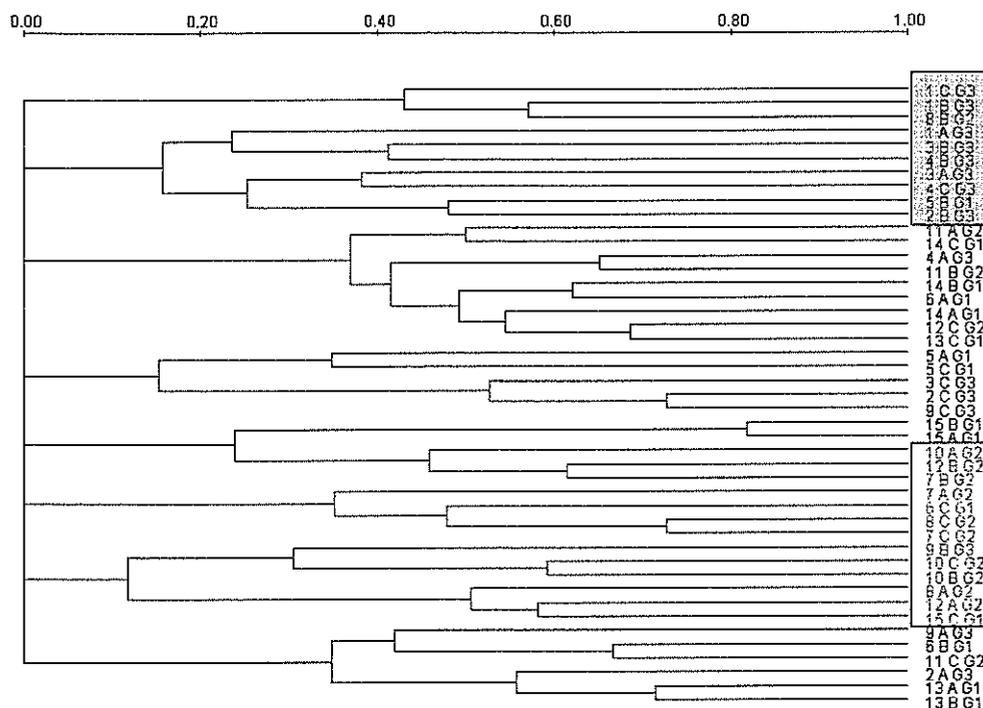


Figure 17 Dendrograma : correlaciones de bandas encontradas entre dietas por PCR-DGGE. (G1) el patrón de bandas de este grupo es el de niños suplementados con probióticos, (G2) suplementados fórmula sin probióticos, (G3) Reciben alimentos regulares. A. Muestra Basal; B. Al mes y C. A los seis meses del estudio

4.5 Resultados del análisis de los geles. Identificación de bandas

El análisis inicial en los patrones de las bandas presentes en los tres grupos indicó la presencia de bandas comunes en todos, sin embargo algunas bandas fueron predominantes en uno o dos de los grupos.

La banda número 1 presente predominantemente en las heces de niños suplementados con alimentos regulares, mientras que las bandas 2 y 3 fueron más comunes en las heces de niños suplementados con fórmulas con y sin probióticos como se observa en las Tablas 5 y 6.

GRUPO 1 FORMULA CON PROBIOTICOS	GRUPO 2 FORMULA SIN PROBIOTICOS	GRUPO 3 ALIMENTOS REGULARES
Nº CODIGO	Nº CODIGO	Nº CODIGO
5	7	1
6	8	2
13	10	3
14	11	4
15	12	9
BANDAS PREDOMINANTES	BANDAS PREDOMINANTES	BANDAS PREDOMINANTES
2 - 3 - 4 - 5	2 - 4 - 5	1 - 4 - 5

Fuente Datos de la investigación

Nº BANDA	Nº ACCESO GEN BANK	BACTERIA IDENTIFICADA	PORCENTAJE DE SIMILITUD
1	AY856700	Bifidobacterium sph12	99%
2	AY736853	Bifidobacterium longum bv infantis	83%
2	AY986349	Bifidobacterium No cultivado	99%
3	AF371550	Bifidobacterium No cultivado	94%
4	AY806191	Streptococcus sp No cultivado	99%
5	AY985751	Streptococcus sp No cultivado	98%

Fuente Datos de la investigación

Estos datos indican que la suplementación a infantes con alimentos regulares o fórmulas con o sin probióticos pueden influir en la composición microbiana de la microbiota fecal.

No fue posible determinar el enriquecimiento con *B. lactis* y *S. thermophilus* de las heces de los niños que recibieron fórmula con probióticos.

Se realizó además PCR real time con “primers” específicos para cada especie bacteriana, no mostró diferencias entre grupos.

Capítulo 5

Conclusiones y recomendaciones

5.1 Discusión y conclusiones

El establecimiento de diferentes dietas como fórmulas infantiles con probióticos a un grupo de sujetos de similares características, permite establecer diferencias en el desarrollo de la microbiota intestinal. El desarrollo posterior en el intestino propiamente dicho, depende de un sin número de factores que son difíciles de controlar como: el ambiente que rodea a cada individuo en su medio familiar, el contacto con el resto de integrantes de la familia y el manejo que cada una de las madres brinde, independiente de las instrucciones que puede recibir del personal de salud.

Los datos presentados indican que el consumo de fórmula con probióticos fue bien tolerado (no manifestaron signos de intolerancia) y seguro para todos los niños participantes. En un reciente reporte de Saavedra y sus colaboradores evaluó la seguridad y tolerancia de los mismos probióticos usados en el presente estudio, en 118 infantes demostrando seguridad en el uso. Además baja frecuencia de cólicos, y poca necesidad del uso de antibióticos en el grupo que recibió probióticos.

No hubo diferencias significativas en el crecimiento y desarrollo entre niños suplementados con fórmula con o sin probióticos en relación al grupo que recibió alimentos regulares, no se observó un incremento mayor en el grupo que recibió probióticos.

Sin embargo todos los niños participantes en el presente trabajo manifestaron aplanamiento de las curvas de crecimiento, en comparación a las curvas estandarizadas de peso, longitud para la edad, aunque dentro de los límites nutricionales normales. La provisión de alimentos en términos energéticos fue similar para los tres grupos y la disponibilidad de alimentos equitativa, sin embargo el aplanamiento, que puede deberse a la exposición de los infantes a una experiencia nueva como es la transición alimentaria, además de la carga higiénica a la que se sometieron y al apareamiento de infecciones, que aunque estuvieron dentro del rango observado, el ideal es que no presenten ninguna de estas enfermedades.

En este punto, la condición socioeconómica, las condiciones salubres y los cuidados básicos según el nivel de instrucción o escolaridad de las madres de los infantes, influye en la expresión máxima de la capacidad de crecer, manifiesta en la curva de crecimiento individual de cada infante.

En el presente estudio todos los niños participantes presentaron similar número de episodios de diarreas e infecciones respiratorias agudas.

Saavedra en su trabajo reporta diferencias significativas en cuanto al mejor crecimiento y menor apareamiento de infecciones en los niños de su estudio que recibieron probióticos; a diferencia de lo observado en esta investigación. La investigación se llevó a cabo en un grupo mestizo (mezcla de indios con blancos-españoles) que vivía en un sector pobre de Quito-Ecuador, en un país en vías de desarrollo, mientras el estudio de Saavedra fue realizado en un área metropolitana de Baltimore-Estados Unidos. Estas condiciones ambientales tan diferentes influyen en las condiciones de higiene y los conocimientos culturales de la población conducen a un comportamiento diferente.

Se logró determinar que la microbiota de niños suplementados con fórmulas con o sin probióticos fue diferente de la microbiota de niños suplementados con alimentos regulares, concluyendo que la dieta cumple un rol importante que define la colonización del intestino de infantes, como parte de la evolución de las bacterias en cada individuo.

Los métodos moleculares usados aquí no fue posible determinar el enriquecimiento de *B lactis* y *S thermophilus* en las heces de niños que consumieron probióticos tal como fue planteada inicialmente la hipótesis.

La fórmula enriquecida con probióticos al ser analizada, se pudo verificar la presencia de las bacterias declaradas en su composición, con un consumo seguro para los infantes.

5.2 Recomendaciones

Es necesario continuar la investigación de la composición de la microbiota en infantes suplementados con probióticos por tiempo prolongado, para definir claramente los efectos fisiológicos de las bacterias introducidas en el intestino. La medición y la identificación de la microbiota ayudarían a responder las interrogantes relacionadas al mecanismo de acción de los probióticos en la inmunidad intestinal, sobre todo en el grupo infantil susceptible en el período de transición alimentaria a las infecciones y desarrollo de posibles trastornos inmunitarios que exageran las respuestas a los procesos inflamatorios y con ello disminuir la morbilidad infantil.

Se recomendaría trabajar con cantidades más altas de probióticos en las fórmulas lácteas puesto que la cantidad consumida es un factor importante que puede determinar la viabilidad de los probióticos.

Es importante que los profesionales en nutrición trabajemos conjuntamente con la industria de alimentos elaborando alimentos funcionales, que además de satisfacer las demandas de palatabilidad del consumidor sean valiosos nutricionalmente y aporten otros beneficios a la salud.

Se debe motivar cuando se practica atención primaria a los responsables del cuidado de menores de un año de edad, en mejorar las condiciones de vida y ambiente saludable, mediante campañas de salud preventiva que se pueden difundir mediante los diferentes medios de comunicación, y de manera personalizadas en centros de cuidado infantil diario, conjuntamente con las guías y recomendaciones sobre alimentación complementaria para menores de un año y lograr un óptimo desarrollo, condición necesaria para asegurar una infancia sin riesgos en desmedro de la salud.

Es muy importante considerar el mejoramiento de las condiciones de salubridad y el acceso al agua segura en los hogares de las familias, factor importante en el desarrollo de enfermedades infecto-contagiosas como IRA y EDA.

5.3 Bibliografía

- 1 Kishan Bhan Maharaj, Bahl Rajiv y Bhandari Nita. "Infection: How important are its effects on child nutrition and growth?." Nestlé Nutrition Workshop Series, Pediatric Program. 47. (2001): 197-213.

- 2 Saavedra José. "Probiotics agents: clinical applications in infants and children." Nestlé Nutrition Workshop Series, Pediatric Program. 47. (2002): 15-27.

- 3 Corrêa Naflesía, Péret Filho Luciano y Penna Francisco. "A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants." J Clin Gastroenterol. 39. 5. (May/June 2005): 385-388.

- 4 Bäckhed Fredrik, Ley Ruth, Sonnenburg Justin, Peterson Daniel y Gordon Jeffrey. "Host - bacterial mutualism in the human intestine." Science. 307. 25 Mar. 2005: 915-1920.

- 5 Bäckhed Fredrik, Ding Hao, Wang y Wang Ting. "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." PNAS. 101. 44. 2 Nov. 2004: 15718-15723.

- 6 Dani Carlo, Biadaioli Roberto y Rubaltelli Firmito. "Potential role of probiotics in the prevention of necrotizing enterocolitis." Nestlé Nutrition Workshop Series, Pediatric Program. 47. (2002): 47-52.

- 7 Giugliani Elsa y Gomes César. "Complementary feeding." Jornal de Pediatria. 0021-7557/00/76-Supl.3 (2000): S253-S262.

- 8 Greiner Ted. "The concept of weaning: Definitions and their implications." J Hum Lact. 12. 2. (1996): 123-128.

- 9 Saavedra José, Abi-Hanna Adel, Moore Nancy y Yolken Robert. "Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety." Am J Clin Nutr. 79. (2004): 261-267.

- 10 McCracken Vance J y Lorenz Robin. "The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota." Cellular Microbiology. 3. 1. (2001): 1-11.
- 11 Ecuador. Instituto Nacional de la Niñez y la Familia. Organismo privado con finalidad social. "Guías alimentarias." Guías Alimentarias. Plan Ecuador. PLAN. INNFA. 2005
- 12 Macpherson Andrew y Harris Nicola. "Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system." Nature Reviews Immunology. 4. (2004): 478-485.
- 13 Duggan Christopher, Gannon Jennifer y Walker W Allan. "Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract." Am J Clin Nutr. 75. (2002): 789-808.
- 14 Harmsen Hermie, Wildeboer-Veloo, Alida C.M, Raangs Gerwin, Wagendorp Arjen, Klijn Nicolette, Bindel Jacques y Welling Gjalte. "Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods." JPGN. 30. 1. (2000): 61-67.
- 15 Berg Rodney. "Probiotics, prebiotics or 'conbiotics' ?." Trends in Microbiology. 6 (1998): 89-92.
- 16 Guandalini Stefano, Pensabene Licia, Zikri Mona Abu, Dias Jorge, Casali Luigi, Hoekstra Handd, Kolacek Sanja, Massar Karinss, Micetic-Turk Dusanka, Papadopoulou Alexandra, De Sousa Jaime, Sandhu Buphinder, Szajewska Hanna y Weizman Zvi. "Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter european trial." JPGN 30. 1 January 2000: 54-60.
- 17 Abbott Allison. "Gut reaction". Nature. 427. (2004): 284-286.
- 18 Zoetendal Erwin, Collier Chad, Koike Satoshi, Roderick Mackie y Gaskins Rex. "Molecular Ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review." J Nutr. 134. (2004): 465-472.

- 19 Perin Nilza, Clandinin Tom y Thomson Alan. "Importance of milk and diet on the ontogeny and adaptation of the intestine." Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 24. (1997): 419-425.
- 20 Favier Christine, Vaughan Elaine, De Vos Willem y Akkermans Antoon. "Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates." Applied and Environmental Microbiology. 68. (2002): 219-226.
- 21 Estados Unidos. Organización Panamericana de la Salud. "Manual de crecimiento y desarrollo del niño." Serie PALTEX para ejecutores de programas de salud. Segunda edición. Washington DC. 1993.
- 22 Pacha Jiri. "Development of intestinal transport function in mammals." Physiological Reviews. 80. 4. (2000): 1633-1657.
- 23 Bonnie Wortington-Roberts. "Human milk composition and infant growth and development nutrition in pregnancy and lactation." Nutrition in Pregnancy and Lactation. (2000): 347-395.
- 24 Uauy Ricardo y Castillo Carlos. "La alimentación en la infancia: lagunas actuales en los conocimientos para el diseño de dietas óptimas durante los dos primeros años de vida." Anales Nestlé. 60. 1. (2002): 36-48.
- 25 Foote KD y Marriott LD. "Weaning of infants." Arch Dis Child. 88. (2003): 488-492.
- 26 Gibson Rosalind y Hotz Christine. "Nutritional causes of linear growth failure during complementary feeding." Nutrition and Growth Nestlé Nutrition. (2001): 159-187.
- 27 Guandalini Stefano y Gupta Puncet. "The role of probiotics in gastrointestinal disorders of infancy and childhood." Nestlé Workshop Series Pediatric Program. 47. (2002): 29-40.
- 28 Motarjemi Y, Kaferstein F, Moy G y Quevedo F. "Contaminated weaning food: a major risk factor for diarrhea and associated malnutrition." Bull World Health Organ. 71. 1. (1993): 79-92. GAB. 04 Jun. 2004. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/> >.

- 29 Behar M. "The role of feeding and nutrition in the pathogeny and prevention of diarrhea processes." Bull Pan Am Health Organ. 9. 1 (1975): 1-9. GAB. 06 Jun. 2004. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/>>.
- 30 Brown Kenneth. "Diarrhea and Malnutrition." J Nutr. 133. (2003): 328S-332S.
- 31 Scrimshaw Nevin. "Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection." J Nutr. 133. (2003): 316S-321S.
- 32 Rowland MG, Rowland SG y Cole TJ. "Impact of infection on the growth of children from 0 to 2 years in an urban west African community." Am J Clin Nutr. 47. 1. (1998): 134-138. GAB. 04 Jun. 2004. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/> > .
- 33 Walter Susan, Chang Susan y Powell Christine. "Psychosocial consequences of early childhood growth retardation." Nestlé Nutrition Workshop Series Pediatric Program. 47. (2001): 241-254.
- 34 Cravioto Joaquín y Cravioto Patricia. "Mental development and malnutrition." Nestlé Nutrition Workshop Series Pediatric Program. 36. (1996): 35-54.
- 35 Ghuliani A y Kaul M. "Contamination of weaning foods and transmission of E coli causation of infantile diarrhea in low income group in Chandigarh." Indian Pediatrics. 32. 5. (1995): 539-542. GAB. 06 Jun. 2004. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/> > .
- 36 Black RE, Brown KH, Becker S, Allim Ar y Merson MH. "Contamination of weaning foods and transmission of enterotoxigenic E coli diarrhoea in children in rural Bangladesh." Trans R Soc Trop Med Hyg. 76. 2. (1982): 259-264. GAB. 04 Jun. 2004. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/>> .
- 37 Motarjemi Y, Kaferstein F, Moy G y Quevedo F. "Contaminated food, a hazard for the very young." World Health Forum. 15. 1. (1994): 69-71. GAB. 04 Jun. 2004. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/>>.
- 38 Prescott Harley y Klein. Microbiología. Mc Graw Hill Interamericana Quinta edición. 2004.

- 39 Cash Heather y Hooper Lora. "Comensal bacteria shape intestinal immune system development." ASM News. 71. 2 (2005): 77-83.
- 40 Mackie Roderick, Sghir Abdelghani y Gaskins Rex. "Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract." Am J Clin Nutr. 69 (suppl). (1999): 1035S-1045S.
- 41 "Prebiotics, probiotics and immunity." Food and Nutrition Communication. Nestlé Nutrition. Junio 2003.
- 42 Cummins Adrian y Thompson Fiona. "Postnatal changes in mucosal immune response: A physiological perspective of breast feeding and weaning." Immunology and Cell Biology. 75. (1997): 419-429.
- 43 Kazmierczak B I, Mostov K y Engel J N. "Interaction of bacterial pathogens with polarized epithelium." Annu Rev Microbiol. 55. (2001): 407-435.
- 44 McCracken Vance y Gaskins Rex. "Probiotics and the immune system." A Critical Review. Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K. (1999): 85-103.
- 45 Reid Greg, Sander M E, Gaskins Rex, Gibson Glenn, Mercenier Annick, Rastall Robert, Roberfroid Marcel, Rowland Ian, Cherbut Christine y Klaenhammer Todd. "New scientific paradigms for probiotics and prebiotics." J Clin Gastroenterol. 37. 2. (2003): 105-118.
- 46 "Consenso sobre probióticos, agentes bioterapéuticos en el manejo de las diarreas (2002). Microorganismos en los alimentos, suplementos alimenticios y medicamentos." Acta Pediátrica Mexicana. 23. 4. (2002): 243-249. GAB. 04 Nov. 2003. <http://www.nietoeditores.commx/articulos.php?id_sec=1&id_art=138&id_ejemplar>.
- 47 "Alimentos funcionales." Revista Enfasis Alimentación Latinoamericana. (2003). GAB. 26 Oct.2003 <http://www.enfasis.com/rev_alim_lat/2003_03_notas.html>
- 48 Pfeifer Andrea, Schiffrin Eduardo, Haller Dirk, Der Weid T Von y Blum Stephanie. "Probiotics and immune function: Insights into mechanisms of modulation of mucosal immunity by selected lactobacilli." Nestlé Nutrition Workshop Series, Pediatric Program. 47. (2002): 1-12.

- 49 Hooper Lora, Wong Melissa, Thelin Anders, Hansson Lennart, Falk Per G y Gordon Jeffrey. "Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine." Science. 291. (2001): 881-884.
- 50 Ramnik Xavier y Podolsky Daniel. "How to get a long-friendly microbe in a hostile World." Science. 289. (2000): 1483-1484.
- 51 Hoyos AB. "Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit." Int J Infect Dis. 3. (1999): 197-202.
- 52 "DRI." Dietary Reference Intakes. (2002). GAB. 06 Jun. 2004.
<http://www.nas.edu>.
- 53 Francia. World Health Organization. "Complementary feeding. Family foods for breastfed children." Department of Nutrition for Health and Development. Francia. 2000.
- 54 Collins David y Gibson Glenn. "Probiotics, prebiotics, and symbiotic: approaches for modulating the microbial ecology of the gut." Am J Clin Nutr. 69 (suppl) (1999): 1052S-1057S.
- 55 D'Souza AL, Rajkumar H, Cooke J, y Bulpitt CJ. "Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis." Brit Med J. 324. (2002): 1361-1366.
- 56 Teske A, Sigolevich P, Cohen Y, y Muyzer G. "Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16 S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures." Appl Environment Microbiol. 62. 11. (1999): 4210-4215.
- 57 Satokari Reeta, Vaughan Elaine, Akkermans Antoon, Saarela María y De Vos Willen. "Bifidobacterial diversity in human feces detected by genes-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis." Appl Environ Microbiol. 67. (2001): 504-513.

- 58 Hartemik R, Kok BJ., Weenk GH y Rombouts FM. "Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria." J Microbiol Methods. 27. (1996): 33-43.
- 59 Dave RI y Shah NP. "Evaluation of media for selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactovacillus delbrueckii ssp, bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria." J Dairy Sci. 79. (1995): 1529-1536.
- 60 Bartosh S, Woodmansey EJ, Paterson JCM, McMurdo ET y Macfarlane GT. "Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria." Clinical Infectious Diseases. 40. (2005): 28-37.
- 61 Tilsala-Timisjarvi A y Alatosava T. "Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR." Inter J Food Microbiol. 35. (1997): 49-56.
- 62 Helms C. "Method: Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)." Update July 1, 1990: 1-10. GAB. 29 Jun. 2004. <[http://www. A:/dgge 1.htm](http://www.A:/dgge1.htm)>.

4. Anexos

ANEXO 1

•

ANEXO 4

ANEXO 4

PUNTAJES Z DE LOS DATOS DE PESO, LONGITUD Y PERIMETRO CEFALICO
DE LOS NIÑOS DEL GRUPO 1

PUNTAJES Z. PESO GRUPO 1						
código	1	2	3	4	5	6
5	1,64	0,70	0,73	0,89	0,85	0,67
6	-0,12	1,14	1,00	1,18	1,02	0,17
13	-0,31	0,12	0,34	-0,26	0,50	0,80
14	-0,12	-0,61	-0,71	-0,69	-0,71	-0,70
15	-1,09	-1,35	-1,36	-1,12	-1,23	-1,57

PUNTAJES Z. LONGITUD GRUPO 1						
código	1	2	3	4	5	6
5	1,64	1,57	1,26	1,24	1,02	1,02
6	-0,35	-0,29	0,18	-0,31	-0,16	0,58
13	0,17	0,22	0,54	0,46	0,70	0,25
14	-0,50	-0,36	-0,72	0,08	0,00	-0,28
15	-0,96	-1,13	-1,26	-1,47	-1,56	-1,58

PUNTAJES Z. PERIMETRO CEFALICO GRUPO 1						
código	1	2	3	4	5	6
5	1,33	1,54	1,24	1,34	1,35	1,89
6	-1,45	-1,18	-1,41	-1,40	-1,43	1,89
13	-0,25	0,07	-0,24	0,16	0,11	0,11
14	0,13	0,22	-0,19	0,27	0,23	0,28
15	0,23	-0,44	0,61	-0,38	-0,26	-0,13

ANEXO 4

PUNTAJES Z DE LOS DATOS DE PESO, LONGITUD Y PERIMETRO CEFALICO
DE LOS NIÑOS DEL GRUPO 2

PUNTAJES Z. PESO GRUPO 2						
código	1	2	3	4	5	6
7	0,39	0,94	0,85	0,57	0,24	-0,24
8	1,23	0,06	0,43	0,31	1,16	1,75
10	0,39	0,94	0,85	0,57	0,24	-0,24
11	-1,29	-0,53	-1,28	-1,77	-1,59	-0,64
12	-0,73	-1,40	-0,85	0,31	-0,06	-0,64

PUNTAJES Z. LONGITUD GRUPO 2						
código	1	2	3	4	5	6
7	0,13	0,75	0,78	0,77	0,83	0,75
8	0,23	-0,50	-0,50	-0,19	0,31	0,57
10	1,13	0,54	0,47	0,29	-0,47	-0,58
11	0,13	0,75	0,78	0,77	0,83	0,75
12	-1,62	-1,53	-1,52	-1,64	-1,51	-1,49

PUNTAJES Z. PERIMETRO CEFALICO GRUPO 2						
código	1	2	3	4	5	6
7	0,08	0,59	-0,02	0,06	-0,55	-0,77
8	1,49	0,59	0,54	0,27	-0,71	0,07
10	-0,92	-1,40	-1,59	-1,49	0,74	0,19
11	0,26	0,93	1,09	1,30	1,38	1,52
12	-0,92	-0,71	-0,02	-0,14	-0,87	-1,02

ANEXO 4

PUNTAJES Z DE LOS DATOS DE PESO, LONGITUD Y PERIMETRO CEFALICO
DE LOS NIÑOS DEL GRUPO 3

PUNTAJES Z. PESO GRUPO 3						
código	1	2	3	4	5	6
1	0,42	0,31	0,29	0,11	0,22	0,38
2	1,13	1,59	1,47	1,23	1,30	0,81
3	0,42	-0,46	-1,18	-1,01	-1,13	-0,47
4	-0,52	-0,46	0,00	0,67	0,49	0,81
9	-1,45	-0,97	-0,59	-1,01	-0,86	-1,53

PUNTAJES Z. LONGITUD GRUPO 3						
código	1	2	3	4	5	6
1	0,36	-0,69	-0,69	-0,73	-0,99	-0,72
2	0,92	0,96	0,80	0,61	0,55	0,36
3	0,76	0,49	0,17	0,04	-0,04	0,36
4	-0,60	0,63	1,04	1,28	1,38	1,27
9	-1,44	-1,40	-1,33	-1,20	-0,91	-1,27

PUNTAJES Z. PERIMETRO CEFALICO GRUPO 3						
código	1	2	3	4	5	6
1	0,82	0,56	0,40	0,00	0,04	0,29
2	-0,30	0,09	0,15	-0,11	-0,06	0,05
3	1,27	1,26	0,78	1,05	0,92	0,69
4	-0,74	-0,61	0,40	0,63	0,72	0,69
9	-1,04	-1,31	-1,74	-1,58	-1,62	-1,72



NESTOGENO®

*Fórmula infantil
de continuación
en polvo,
con hierro*

2



*A partir del
6º mes*

CONTENIDO NETO 450 g

Información Nutricional

Ingredientes: Leche descremada, sacarosa, oleína de palma, maltodextrina, aceite de canola, aceite de palmiste, aceite de maíz, sales minerales, lecitina de soja y vitaminas.

Composición Media	por 100g de polvo	Por 100 ml de fórmula reconstituida
Energía	kcal 478	67
Grasas	kJ 2000	282
Ácido linoleico	g 21.5	3.0
Ácido α-linolénico	g 3.3	0.5
Proteínas	mg 413	58
Hidratos de carbono	g 19.7	2.8
Sales minerales (Cenizas)	g 51.4	7.3
Sodio	mg 280	39
Potasio	mg 920	130
Cloruro	mg 660	93
Calcio	mg 715	101
Fósforo	mg 585	82
Magnesio	mg 65	9
Humedad	g 3.0	-
Vitamina A	UI 1900	270
Vitamina D	µgER 570	81
	UI 430	61
Vitamina E	µg 11	1.5
Vitamina K1	UI 5.7	0.81
Vitamina C	µg 22	3.0
Vitamina B1	µg 48	6.7
Vitamina B2	µg 0.72	0.100
Niacina (PP)	mg 1.10	0.160
Vitamina B6	mg 13.0	1.80
Ácido fólico	µg 0.96	0.130
Ácido pantoténico	µg 140	20.0
Vitamina B12	µg 3.3	0.47
Biotina	µg 0.96	0.13
Colina	µg 16	2.3
Inositol	µg 48	6.7
Hierro	mg 24	3.4
Yodo	µg 8.1	1.10
Cobre	µg 100	14.0
Zinc	mg 0.57	0.080
Manganeso	mg 5.7	0.81
Ca/P	µg 33	4.7
	1.2	

Una medida = 4.7 g; 100 ml = 14.4 g de polvo + 90 ml de agua.



APELLIDOS PATERNO

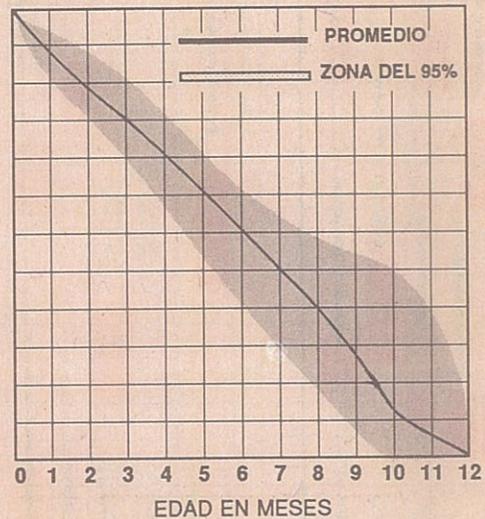
MATERNO

NOMBRES

Nº HISTORIA CLINICA UNICA

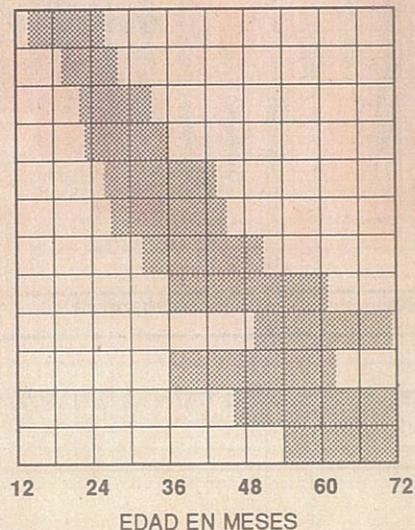
NORMAS PARA LA EVALUACION DEL DESARROLLO DE LOS 12 PRIMEROS MESES DE EDAD (Adaptado de Aldrich y Norval)

- Sonríe: Como respuesta a un adulto o a su voz
- Vocaliza: Emite sonidos espontáneamente o merced a un estímulo
- Controla la cabeza: La cabeza no cae hacia atrás cuando se tira de él para sentarlo estando en posición supina
- Controla la mano: Sujeta un juguete con una o ambas manos cuando cuelga por encima de él
- Se rueda: De boca arriba a boca abajo
- Se sienta solo: Durante algunos momentos
- Comienza a andar a gatas: Rodándose, empujándose sobre el abdomen o sobre la espalda
- Prensa: Junta el pulgar con el índice para tomar pequeños objetos
- Se pone de pie cuando se tira de él
- Camina sin ayuda: Sujetándose de un barandal, de los muebles o de un adulto
- Se para solo: Sin ayuda, durante algunos momentos
- Camina solo: Da varios pasos



NORMAS PARA LA EVALUACION DEL DESARROLLO DE LOS 12 A LOS 60 MESES DE EDAD (Adaptado de Barrera-Moncada)

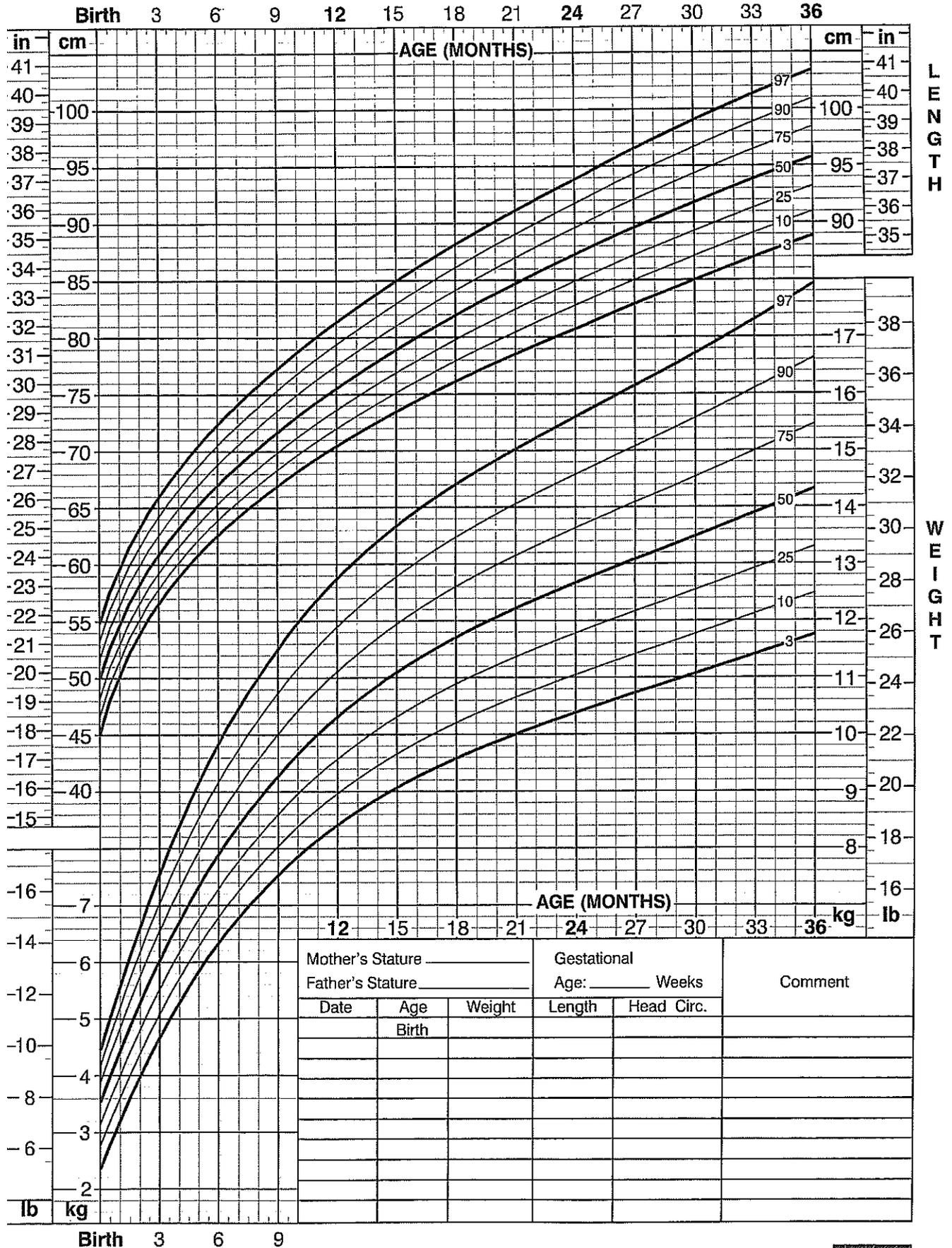
- Bebe bien de taza o vaso
- Vocaliza más de cinco palabras
- Salta en dos pies
- Se lava y seca las manos
- Dice su nombre completo
- Copia un círculo
- Se balancea en un solo pie más de cinco segundos
- Controla esfínteres
- Copia bien un cuadrado
- Reconoce cuatro colores básicos
- Retrocede colocando un pie detrás de otro
- Reconoce el material de cuchara, puerta, zapato



Birth to 36 months: Boys
 Length-for-age and Weight-for-age percentiles

NAME _____

RECORD # _____



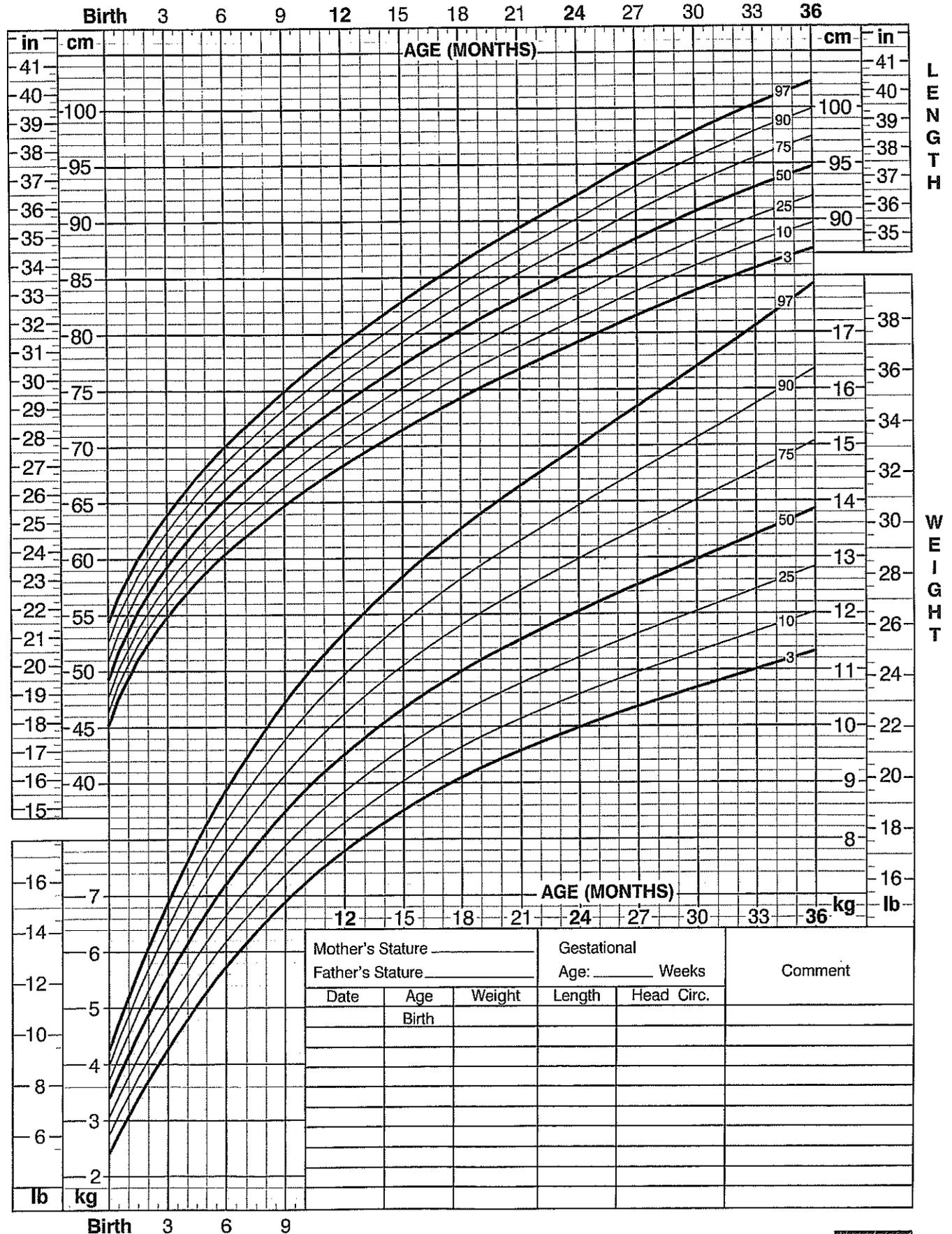
Revised November 21, 2000.
 SOURCE: Developed by the National Center for Health Statistics in collaboration with
 the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (2000).
<http://www.cdc.gov/growthcharts>



Birth to 36 months: Girls
Length-for-age and Weight-for-age percentiles

NAME _____

RECORD # _____



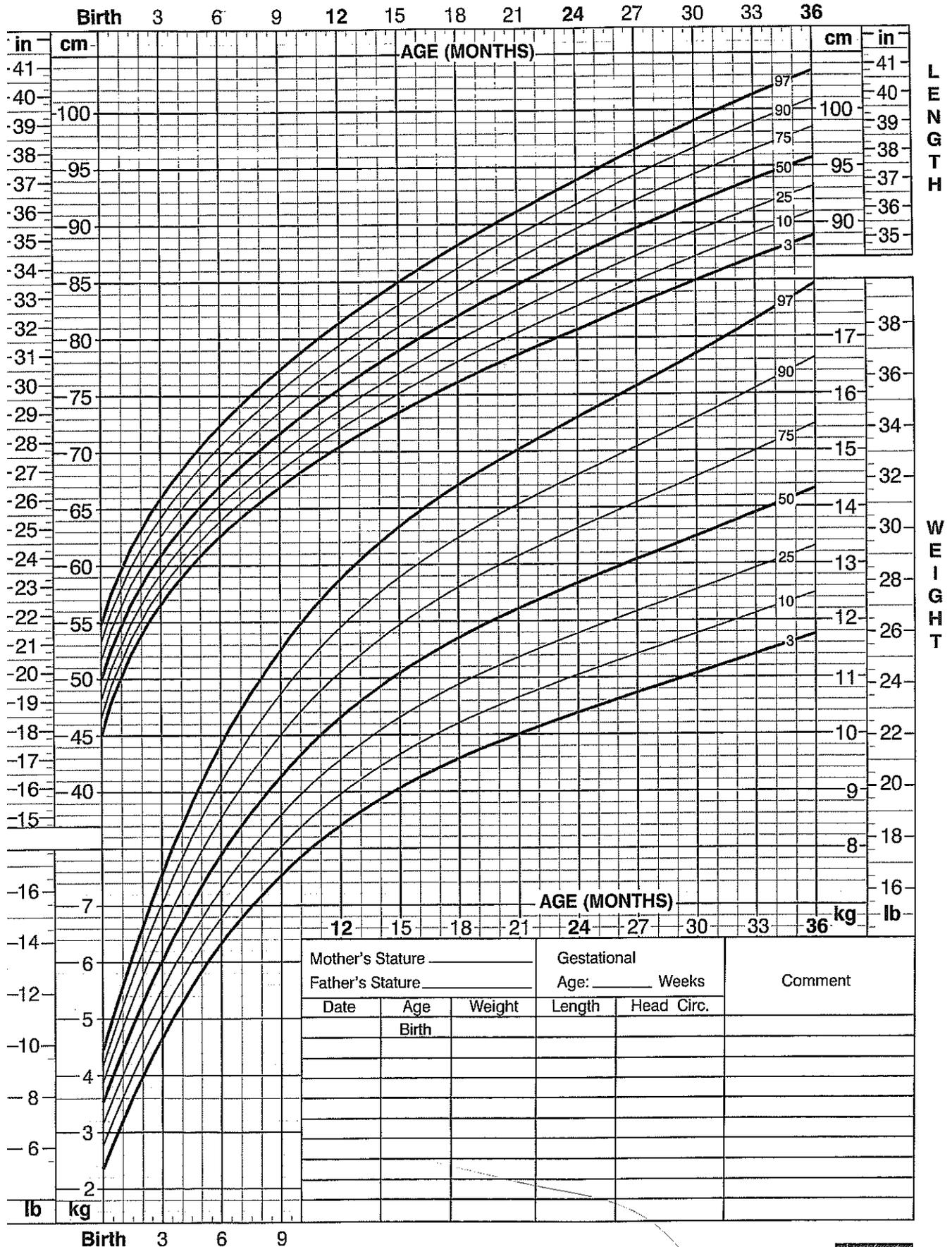
Revised November 21, 2000.
 SOURCE: Developed by the National Center for Health Statistics in collaboration with
 the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (2000).
<http://www.cdc.gov/growthcharts>



Birth to 36 months: Boys
Length-for-age and Weight-for-age percentiles

NAME _____

RECORD # _____



Mother's Stature _____			Gestational Age: _____ Weeks		Comment
Father's Stature _____			Length	Head Circ.	
Date	Age at Birth	Weight			

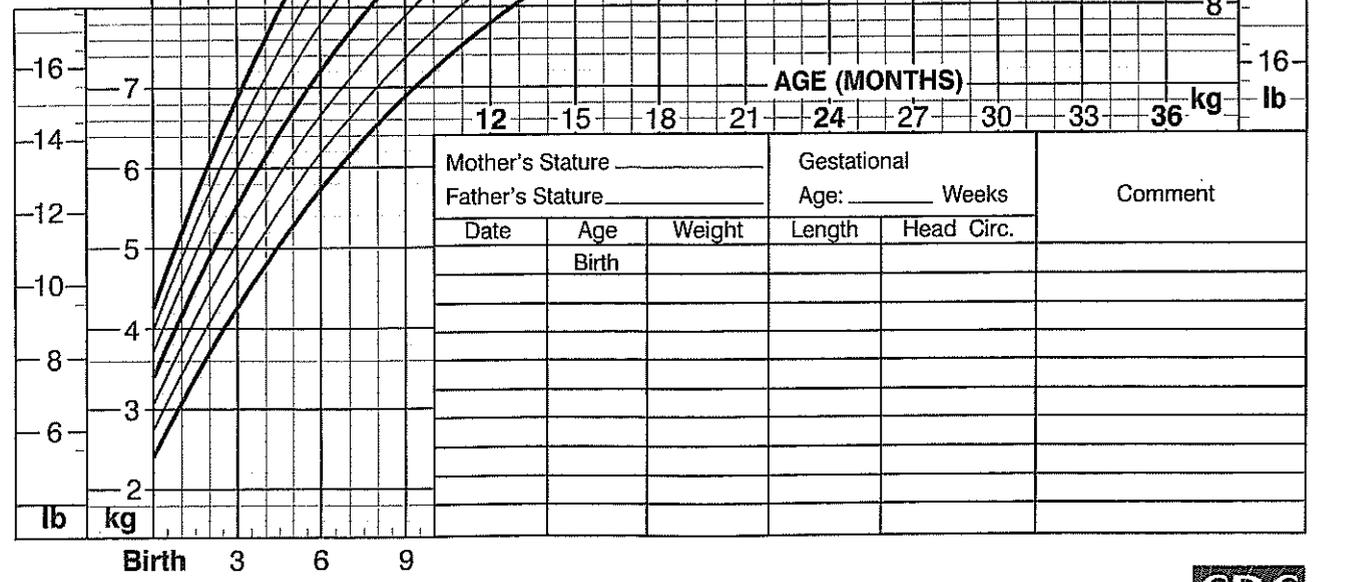
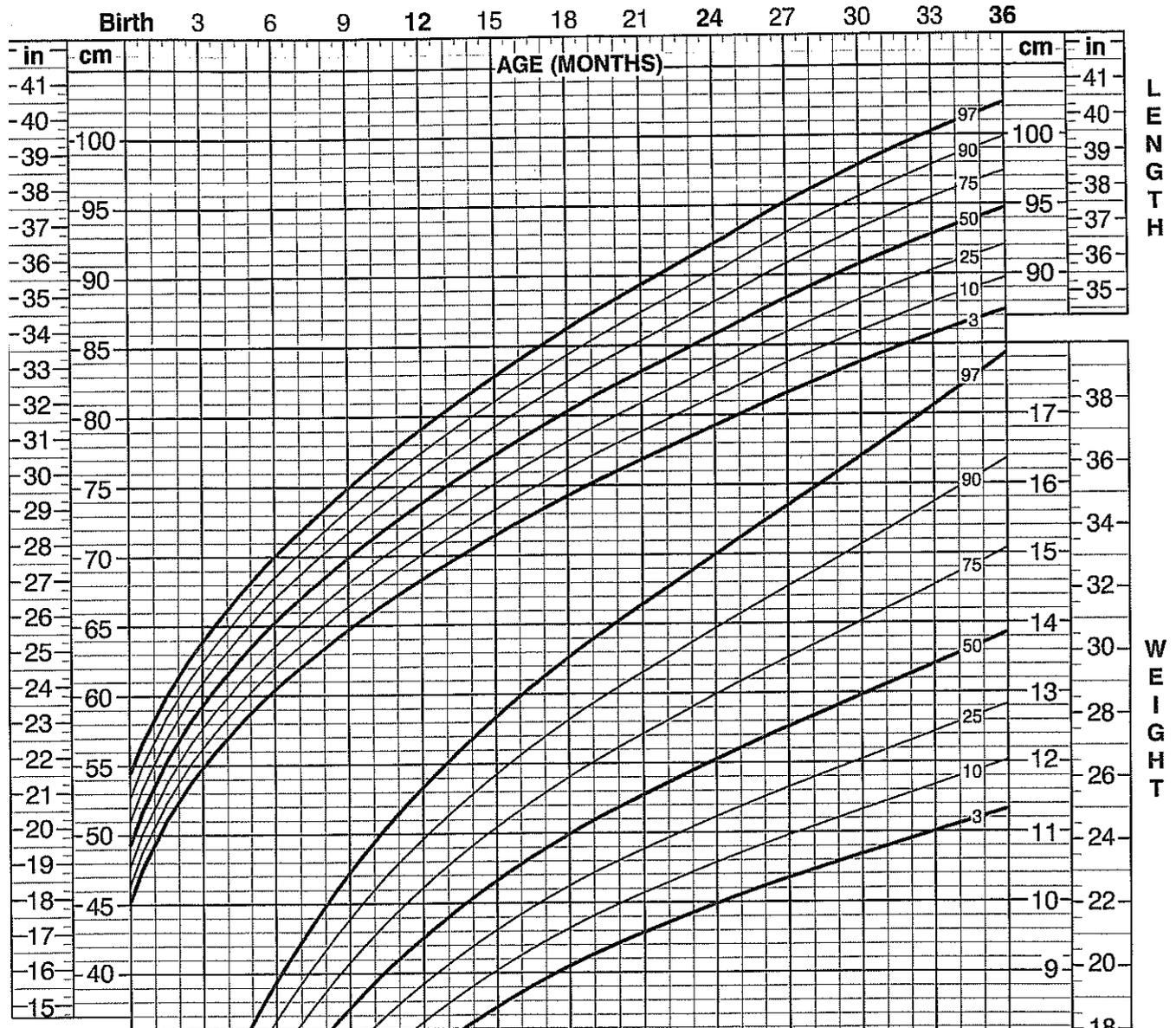
Revised November 21, 2000.
 SOURCE: Developed by the National Center for Health Statistics in collaboration with the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (2000).
<http://www.cdc.gov/growthcharts>



Birth to 36 months: Girls
Length-for-age and Weight-for-age percentiles

NAME _____

RECORD # _____



Mother's Stature _____			Gestational Age: _____ Weeks		Comment
Father's Stature _____			Length	Head Circ.	
Date	Age at Birth	Weight			

Birth 3 6 9

Revised November 21, 2000.
 SOURCE: Developed by the National Center for Health Statistics in collaboration with the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (2000).
<http://www.cdc.gov/growthcharts>



ANEXO 3

ANEXO 2

