



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina

División de Estudios de Posgrado e Investigación
Secretaría de Salud
Instituto Nacional de Pediatría

**ESTUDIO DE LA EFICACIA DE METLIN® Y METILOS®
INCORPORADOS
A LA FÓRMULA INFANTIL DE LACTANTES SANOS**

Trabajo de investigación

Para obtener el título de:

Especialista en Pediatría

Presenta:

Dra. Minerva Parra Ortíz

Tutor de tesis

Dr. Pedro Gutiérrez Castellón

Co-Tutor de Tesis

Dr. en C. Gabriel López Velázquez



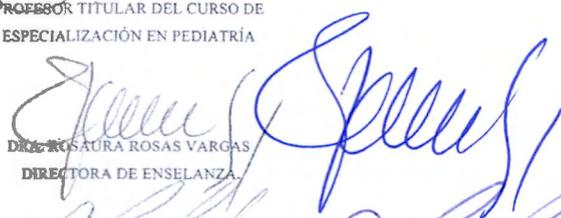
INP
CENTRO DE INFORMACION
Y DOCUMENTACIÓN

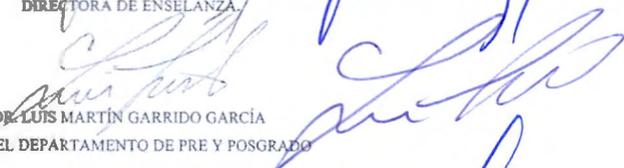
México D.F. 2013

C I D
NO CIRCULA

ESTUDIO DE LA EFICACIA DE METLIN® Y METLOS® INCORPORADOS
A LA FORMULA INFANTIL DE LACTANTES SANOS


DR. ALEJANDRO SERRANO SIERRA
DIRECTOR GENERAL INP
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE
ESPECIALIZACIÓN EN PEDIATRÍA


DR. ROCSAURO ROSAS VARGAS
DIRECTORA DE ENSEÑANZA


DR. LUIS MARTÍN GARRIDO GARCÍA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO


DR. PEDRO GIL LÓPEZ CASTRELLÓN
TUTOR DE TESIS


DR. GABRIEL LÓPEZ VELÁZQUEZ
CO-TUTOR DE TESIS



INDICE

Agradecimientos	2
Resumen	3
Abstract	4
Antecedentes y Marco Teórico	5
Inulina y Fructooligosacáridos	6
Prebióticos	7
Efecto de los Prebióticos en el sistema inmune	9
Metlin® y Metlos®	11
Composición Química	12
Justificación	13
Planteamiento del Problema	14
Pregunta de Investigación	14
Objetivos	15
Hipótesis	15
Material y Métodos	15
Tamaño de la Muestra	16
Criterios de Inclusión	17
Criterios de Exclusión	18
Análisis Estadístico	19
Metabolismo Óseo	20
Aislamiento de ADN a partir de heces	20
Análisis cuantitativo de las bacterias presentes en las heces mediante PCR en tiempo real	20
Determinación de IgA en saliva	23
Resultados	24
Efecto en la respuesta inmune	24
Impacto en el Metabolismo Óseo	25
Cambios en la microbiota intestinal	26
Discusión	28
Conclusiones	32
Referencias	33

I N P
CENTRO DE INFORMACION
Y DOCUMENTACIÓN

Agradecimientos:

A mis papás Ángela y José Manuel

Por haberme apoyado en todo momento, por confiar plenamente en mí, por sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, por el valor mostrado para salir adelante, pero más que nada, por su amor y cariño incondicional que siempre me han dado.

A Gabriel

Por todo el apoyo para la realización de este trabajo, que sin ello hubiera sido demasiado pesado el camino, por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado, por su apoyo incondicional.

Gracias Chaparrito!

A mis familiares

A mi hermana Marina por su apoyo incondicional, por creer en mí, a Nelson y Alejandra por el cariño, la confianza que me tienen y por sus buenos deseos, a mis niños hermosos; Gael, David y Ashley por ser una razón de mi alegría, porque con su simple presencia y una sonrisa hacían mi vida plena y quitaban la carga que llevaba y me hacían recordar la razón por la cual el ser pediatra es la mejor especialidad. Esperando que sea un estímulo para la superación de todos ustedes.

“Especialmente a ti chata que has sido una mujer asidua en el camino de la superación personal y académica”...sigue adelante.

Al Instituto Nacional Pediatría

Porque las enseñanzas que ahí obtuve forjaron mi carácter para poner siempre por delante la calidad y calidez que se le debe de dar a nuestros niños. Porque el INP representa para la niñez mexicana una de sus más importantes esperanzas para tener una vida mejor.

Resumen

Introducción. El uso de los probióticos y prebióticos está aumentando en todo el mundo debido a sus efectos benéficos sobre la salud. El desarrollo de mejores prebióticos y probióticos hace posible tener resultados más eficaces en la prevención de la salud en la población. **Objetivo.** Demostrar la eficacia de dos fructanos obtenidos del *Agave tequilana* (Metlin® y Metlos ®) incorporados a la fórmula infantil de lactantes sanos. **Métodos.** Ensayo clínico, controlado, aleatorizado, doble ciego, realizado en 600 recién nacidos a término y seguido durante sus primeros 6 meses de edad. Los recién nacidos se asignaron al azar en seis grupos de estudio: 1) Fórmula adicionada con probiótico + Metlin + Metlos; 2) Fórmula adicionada con probiótico + Metlin; 3) Fórmula adicionada con probiótico + Metlos; 4) Fórmula adicionada con probiótico y 5) Fórmula sin probiótico ni prebióticos.. Las mediciones de características antropométricas; IgA salival y la excreción de DPD en orina se analizaron para cada grupo de recién nacidos. En un subgrupo se analizó la microbiota al nacimiento y 6 meses después, utilizando PCR en tiempo real. **Resultados.** Las IgAs de saliva de los grupos que consumieron los fructanos en cuestión siempre estuvieron por encima de los valores obtenidos en el grupo de lactantes que solo consumieron fórmula, e inclusive por encima del grupo que consumió la fórmula adicionada con probióticos. Los niños alimentados exclusivamente con leche materna, tuvieron un incremento significativo en la concentración de DPD con respecto a los demás grupos. Por otra parte, los niños alimentados con fórmula únicamente, tuvieron el menor de los incrementos. Con respecto a los cambios en la microbiota intestinal, la combinación Metlin + Metlos es la que tiene un mayor efecto bifidogénico. En los grupos que tienen Metlin o Metlos por separado, al igual que en el grupo de lactancia materna, se ve una disminución de Enterobacterias. **Conclusión.** Nuestros resultados demuestran la eficacia de Metlos ® y Metlin® en los recién nacidos sanos y sientan las bases para recomendar su consumo.

Abstract

Introduction. The importance of probiotics and prebiotics is increasing worldwide due to its beneficial effects on health. Developing better prebiotics and probiotics creates the possibility of more effective results in the prevention of health in the population. **Objective.** To demonstrate the efficacy of two fructans obtained from *Agave tequilana* (Metlin © and Metlos ©) added to infant formula of healthy infants. **Methods.** Randomized double blind clinical controlled trial, conducted in 600 term babies and followed during their first 6 months of age. Infants were randomly allocated in 6 study groups: 1) Formula supplemented with probiotic + Metlos + Metlin; 2) Formula + probiotic + Metlin; 3) Formula with probiotic + Metlos; 4) Formula with probiotic and 5) Formula without probiotic or prebiotic. Anthropomorphic measurements; salivary IgA and DPD excretion in urine were analyzed for each group of infants. In a subgroup, microbiota was analyzed at birth and 6 months after, using real-time PCR. **Results.** The saliva sIgA groups consuming fructans in question were always above the values obtained in the group of infants who consumed only formula, and even above the group consuming formula supplemented with probiotics. Children exclusively breast fed, had a significant increase in the concentration of DPD in relation to other groups. Moreover, infants fed formula only, had the smallest increases. With regard to changes in the intestinal microbiota, the combination METLIN + Metlos is having a higher bifidogenic effect. In groups having Metlos METLIN or separately, as in the group breastfeeding is decreased Enterobacteriaceae. **Conclusion.** Our results demonstrated the efficiency of Metlos © y © Metlin in healthy newborns and support the bases to recommend their consumption.

ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

GENERALIDADES DE LAS FIBRAS DIETÉTICAS.

Los cambios económicos y sociales de nuestros días han influido en los hábitos alimenticios y por ende, esto ha repercutido en la salud poblacional. Así, uno de los retos más importantes a los que se enfrentan los profesionales en Salud y Nutrición es la cada vez más escasa inclusión de fibra en la dieta. Desde mediados del siglo XX se han estudiado los efectos benéficos a la salud mediados por la fibra (Trowell, 1976). Con base en toda la evidencia científica que hoy día soporta el efecto benéfico en salud de la fibra en la dieta, diversas organizaciones vinculadas con la salud alimenticia recomiendan el consumo de la misma (Slavin, 2008).

En el 2008 se llegó a un acuerdo consensado en el Comité Codex en Nutrición y Alimentos para el Uso de Dietas Especiales (CCNFSDU por sus siglas en inglés), en cuanto a la definición de fibra dietética. El establecimiento de esta definición sienta las bases a nivel mundial para su uso en la implementación de mediciones, etiquetado de alimentos, valores nutricionales de referencia y declaración de propiedades para la salud (*health claims*). En este sentido, las fibras dietéticas incluyen a los polímeros de carbohidratos que no pueden ser hidrolizados por enzimas endógenas del intestino delgado del ser humano (Cummings, et al., 2009).

Las fibras dietéticas se clasifican a su vez en las siguientes categorías.

- a) Polímeros de carbohidratos comestibles que se encuentran naturalmente en los alimentos.
- b) Polímeros de carbohidratos obtenidos a partir de alimentos, utilizando métodos físicos, enzimáticos o químicos, los cuales han demostrado tener un efecto fisiológico de beneficio a la salud y son aceptados como tal por las autoridades competentes con base en la evidencia científica que sustenta dichas propiedades.
- c) Polímeros de carbohidratos sintéticos, los cuales han demostrado tener un efecto fisiológico de

beneficio a la salud y son aceptados como tal por las autoridades competentes con base en la evidencia científica que sustenta dichas propiedades. A su vez, las fibras dietéticas se dividen en solubles e insolubles (AACC REPORT, 2001; Meyer y Tunland, 2002). Las fibras insolubles son aquellas fibras como la celulosa, hemicelulosa, lignina y almidón no digerible, las cuales no se disuelven en agua pero tienen la capacidad de absorberla. Algunos alimentos ricos en fibra insoluble son la harina de trigo, el salvado, (alimentos integrales), guisantes, col, tubérculos, cereales y frutas maduras. Las fibras solubles son aquellas fibras como pectinas, gomas, inulina y fructooligosacáridos (FOS), las cuales son solubles en agua y cuando llegan al intestino forman una especie de gel o gelatina. Son ricos en fibra soluble la avena, las ciruelas, la zanahoria, los cítricos, judías secas, la achicoria y el agave, entre otros.

Inulina y Fructooligosacáridos (FOS)

Los oligosacáridos son cadenas de hasta 20 azúcares (de manera arbitraria se determina este número de monosacáridos), por encima de este número se habla de polisacáridos. Cada unidad o monosacárido se une en la cadena mediante un enlace glicosídico. Este enlace se forma cuando los grupos OH, NH₂ y SH reaccionan con el OH hemiacetálico del carbono anomérico de un monosacárido, con la consiguiente pérdida de una molécula de agua. Los oligo y polisacáridos pueden ser lineares o ramificados. Los fructanos son una categoría de compuestos que abarca a todos los oligo y polisacáridos que se encuentran naturalmente en las plantas. En los fructanos una o más de sus uniones fructosil-fructosa (enlace glicosídico entre dos fructosas) comprenden la mayoría de sus enlaces glicosídicos. Es por esto que dichos compuestos son esencialmente polímeros de fructosa. Sin embargo, al menos uno de sus enlaces glicosídicos es del tipo fructosil-glucosa (enlace glicosídico entre fructosa y glucosa) (Tunland and Meyer, 2002; Kelly, 2008).

La inulina es un fructano de reserva energética presente en más de 36, 000 especies de plantas

(Franck, 2002), aislada por primera vez en 1804, a partir de la especie *Inula helenium*, por un científico alemán de apellido Rose. En 1818, Thomson, un científico británico, le dio el nombre actual (Franck, 2002). Inulina es el nombre genérico que se le da a los fructanos lineares con enlaces glicosídicos $\beta(2\rightarrow1)$ fructosil-fructosa (Roberfroid, 2007, Meyer y Stasse-Wolthuis, 2009). Este tipo específico de enlace glicosídico es el que confiere sus propiedades estructurales y fisiológicas a la inulina ya que la configuración beta impide que sea hidrolizada por las enzimas digestivas de la saliva y el intestino delgado del humano, las cuales son específicas para hidrolizar los enlaces alfa glicosídicos (Kelly, 2008). Las cadenas de fructosa de la inulina tienen la particularidad de terminar en una unidad de glucosa unida por un enlace $\alpha(1\rightarrow2)$ (residuo -D-glucopiranosil), como en la sacarosa (Flamm, et al., 2001), pero también el monómero terminal de la cadena puede corresponder a un residuo de β -D-fructopiranosil (Roberfroid, 1999; 2007). Después del almidón, los fructanos son los polisacáridos no estructurales más abundantes en la naturaleza, presentes en muchas especies de plantas.

El FOS se diferencia de la inulina únicamente en la longitud de su cadena y en la forma en que se obtienen (Meyer y Tunland, 2002; Madrigal y Sangronis, 2007). Así, la inulina tiene un rango en promedio de polimerización (GP o DP por sus siglas en inglés) de 2-60 unidades y se obtiene directamente por aislamiento a partir de vegetales, mientras que el FOS tiene un rango de GP de 2-4 unidades y se obtiene mediante la transfructosilación de la sacarosa. Una de las características importantes de la inulina y el FOS es su propiedad de prebióticos.

Prebióticos.

La definición de prebiótico fue revisada y replanteada por Roberfroid (Roberfroid, 2007) de la siguiente manera: *“un prebiótico es un ingrediente de fermentación selectiva que promueve cambios específicos, tanto en la composición como actividad de la microbiota intestinal, lo cual*

confiere beneficios en la salud del hospedero”.

En general, las definiciones de prebióticos enfatizan el hecho de que son compuestos no digeribles que, por lo tanto, son sujetos a la fermentación y digestión enzimática de las bacterias que habitan el colon. Al mismo tiempo se considera que los prebióticos son capaces de estimular el desarrollo selectivo de bacterias intestinales que mejoran el estado de salud. Aunque la definición no especifica los grupos de bacterias, para calificar como prebiótico, el número y actividad de Bifidobacterias, así como de bacterias productoras de ácido láctico debe aumentar (Kelly, 2008). A partir de la implementación de la nomenclatura relacionada con estos compuestos, se pueden identificar muchos componentes nutrimentales con algún grado de actividad prebiótica. No obstante, la inulina y el FOS son los prebióticos más estudiados. Gracias a las propiedades de la inulina y el FOS, estos no son degradados en el intestino delgado y llegan intactos al colon, donde las bacterias que lo habitan los fermentan para formar ácidos grasos de cadenas cortas y gases (Meyer y Stasse-Wolthuis, 2009). Entre los principales ácidos grasos que se forman, se encuentran el acetato, propionato y butirato, además del lactato que es un importante intermediario en la formación de estos ácidos grasos. A diferencia de los productos que resultan de la hidrólisis de proteínas y la fermentación de amino ácidos (amonio, fenoles, indoles, tioles, sulfatos y aminas) que resultan tóxicos en diferentes niveles, los productos de la fermentación de la inulina y el FOS son benéficos para la salud del hospedero (de Graaf y Venema, 2008).

Aunado a todo lo anterior, se considera a la Inulina y FOS como fibras solubles que no aportan sabor ni viscosidad cuando se adicionan en líquidos y alimentos. Estas propiedades permiten generar formulaciones de alimentos con alto contenido en fibra pero de sabor y apariencia similar a la de las formulaciones de alimentos estándar (Niness, 1999).

La nutrición infantil es de suma importancia y la nutrición temprana es fundamental para la vida futura del niño. El presente proyecto representó un gran avance en nuestro país en el proceso

tendiente a modificar políticas de alimentación. Esto es importante ya que hoy en día la inclusión de prebióticos y probióticos en los alimentos no es considerado obligatorio, a diferencia de otros países de Norteamérica y Europa donde sí lo es.

Efecto de los prebióticos en el sistema inmune.

Los componentes de la dieta así como los productos de su digestión están en íntimo contacto con el vasto sistema inmune del intestino (tejido linfóide asociado al intestino) y la presencia de comida en el intestino delgado puede ser necesaria para la función y desarrollo adecuados de este tejido linfóide intestinal (Ruthlein et al. 1992). Aunque se sabe que hay nutrientes específicos que son importantes para la función y desarrollo del sistema inmunológico (Alexander, 1995), poco se sabía del potencial de las fibras dietéticas y su impacto en el sistema inmune. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la administración de fibra dietética disminuye la incidencia de la translocación bacteriana a través de la barrera intestinal, lo cual sugiere que estas regulan la inmunidad. (Deitch et al. 1993; Spaeth et al. 1994; Frankel et al. 1995; Xu et al. 1998).

Ya se ha demostrado que el consumo de fibra dietética promueve el establecimiento de bacterias benéficas ácido lácticas en el colon (Mitsuoka et al. 1987; Gibson et al. 1995; Buddington et al. 1996; Bounnik et al. 1996; Kleesen et al. 1997; Menne et al. 2000). Los mecanismos por los cuales las bacterias benéficas afectan al sistema inmune sigue siendo motivo de especulaciones hoy en día. Un mecanismo lógico podría ser la estimulación inmunológica a través del contacto directo de la microbiota con el tejido linfóide asociado al intestino. Un bajo número de bacterias pueden atravesar la barrera del epitelio intestinal dentro de los parches de Peyer (Berg, 1985), induciendo su activación o propiciando la activación de otras células inmunes (Berg, 1985; De Simone et al. 1987; Link-Amster et al. 1994; Schiffrin et al. 1995). Otros autores han propuesto que no son las bacterias sino componentes de las mismas (p. ej. antígenos citoplasmáticos, componentes de la

pared celular) las que penetran el epitelio intestinal para activar el tejido linfóide asociado al intestino (De Simone et al. 1987; Perdigon et al. 1988; Solis Pereyra y Lemonnier, 1993; Takahashi et al. 1998; Tejada-Simon et al. 1999). No se sabe exactamente cómo es que estos componentes celulares actúan para estimular el sistema inmune. Se ha sugerido que pueden existir receptores con sitios de unión para las bacterias ácido lácticas en los linfocitos (CD4+ and CD8+) (De Simone et al. 1988). Además, los péptidoglicanos pueden unirse a los antígenos CD14 de la superficie celular y pueden estimular a los fagocitos mononucleares y a las células endoteliales para liberar citosinas (Matsuzaki, 1998).

También se plantea que la microbiota intestinal puede modular la respuesta inmune celular a través de la fermentación de las fibras dietéticas hacia ácidos grasos de cadena corta. Se encuentra bien establecido el hecho de que la fermentación de la inulina y de la oligofructosa incrementa la producción de ácidos grasos de cadena corta, acetato primario, butirato y propionato en el intestino (Gibson y Roberfroid, 1995).

La inmunoglobulina IgA es una proteína que contribuye a la inmunidad del organismo, predominando en su forma secretora en: lágrimas, sudor, mucosidad bronquial e intestinal, saliva, leche materna y calostro; esta proteína es un dímero que es producido por las células plasmáticas de la mucosa, a esta se le adiciona otra proteína llamada "J" y un polipéptido llamado componente secretor el cuál es sintetizado por las células epiteliales, todo este complejo se arma y es enviado al lumen intestinal; esta proteína también se encuentra en forma circulante, por lo que la concentración en mucosas depende directamente de la concentración sérica. El papel principal de esta inmunoglobulina es evitar la adherencia de agentes biológicos, neutralizar virus y evitar la absorción de posibles alérgenos, entre otros.

Metlin y Metlos.

Metlin y Metlos son fructanos obtenidos de la planta *Agave tequilana* var. Weber mediante procesos industriales propiedad de Nektli S.A. de C.V. La principal diferencia entre los fructanos de Agave y otros tipos de fructanos (siendo los más estudiados las inulinas) es precisamente el tipo de enlaces presentes en la molécula. En los fructanos de Agave se encuentran presentes enlaces tipo β (2 \rightarrow 1) y β (2 \rightarrow 6), lo que hace que la molécula sea ramificada. En la figura 1 se muestran tres de los posibles isómeros presentes en la molécula DP5 (DP, *degree of polymerization*; es decir, número de unidades monoméricas que constituyen al polímero).

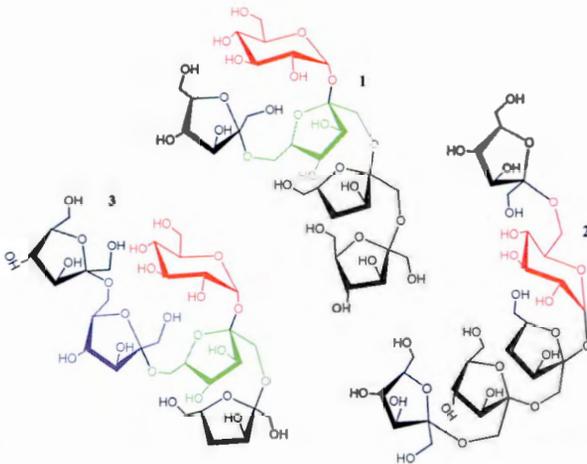


Fig. 1. Diferentes isómeros presentes en la molécula de fructanos de Agave (DP5)

La diferencia entre los tipos de enlace tiene varios efectos, entre los que se encuentran diferentes solubilidades (siendo los fructanos de Agave mucho más solubles que los tipo inulina) y diferentes especificidades a las enzimas que pueden hidrolizarlos.

En las siguientes tablas se muestran las diferencias entre los dos prebióticos utilizados. Como enseguida se muestra, Metlos contiene una mayor cantidad de monosacáridos y disacáridos. La segunda gran diferencia se encuentra en los pesos moleculares de ambos prebióticos.

Con respecto a la diferencia de pesos moleculares, Metlin tiene un DPw promedio de 27, con 84.5% w/w de los fructanos con un DP mayor a 10, 15.5% menor a DP10 y un índice de polidispersión de

2.3. Para Metlos corresponden valores de DPw 15, 55% > DP10 > 45% e índice de polidispersión

3.3. Estos valores fueron obtenidos utilizando cromatografía de exclusión molecular (*SEC:Size Exclusion Chromatography*).

Metlos®

Composición Química:

valores expresados como materia seca

	Parámetro (%)
Humedad	0.0 - 5.5
Carbohidratos totales	98.0 - 99.5
Fructanos	90.0 - 99.5
Fructosa-Glucosa-Sacarosa	0.0 - 8.5
Cenizas	< 0.20
Grasa	0.0
Colesterol	0.0

Metlin®

Composición Química:

valores expresados como materia seca

	Parámetro (%)
Humedad	0.0 - 5.5
Carbohidratos totales	98.0 - 99.5
Fructanos	90.0 - 99.5
Fructosa-Glucosa-Sacarosa	0.0 - 5.0
Cenizas	< 0.20
Grasa	0.0
Colesterol	0.0

Con respecto a la diferencia de pesos moleculares, Metlin tiene un DPw promedio de 27, con 84.5% w/w de los fructanos con un DP mayor a 10, 15.5% menor a DP10 y un índice de polidispersión de 2.3. Para Metlos corresponden valores de DPw 15, 55% > DP10 > 45% e índice de polidispersión 3.3. Estos valores fueron obtenidos utilizando cromatografía de exclusión molecular (*SEC:Size Exclusion Chromatography*).

Justificación:

La alimentación temprana equilibrada y con adición de ingredientes activos funcionales es fundamental para lograr un crecimiento, desarrollo y prevención de determinadas enfermedades a futuro en la vida del niño. Las fibras dietéticas con acción prebiótica representan uno de los ingredientes bioactivos de mayor interés por su impacto en la salud a mediano y largo plazo. Existe diversa evidencia con rigor científico y metodológico que ha asociado el uso de prebióticos como los FOS y los GOS con una mejora en la microbiota intestinal benéfica del lactante, en el control del perfil de lípidos, del metabolismo mineral óseo y de la inmunidad en general. Los productos en estudio (Metlin y Metlos) han sido probados en modelos *in vitro*, en animales e incluso se han realizado pruebas con bioreactores simulando el tracto intestinal. Todos los reportes han sido exclusivos de la empresa Nektli, excepto por la dilucidación de la estructura de las moléculas, las cuales fueron realizadas por un trabajo comisionado al Dr. Werner Praznik, Universidad BOKU, Vienna. Recientemente también se comprobó la seguridad de ambos fructanos al adicionarlos a la fórmula infantil de lactantes mexicanos sanos (López-Velázquez, et al., 2013). Es necesario aportar el sustento científico que conlleve al uso de fibras dietéticas adicionadas a la dieta del mexicano, principalmente desde la etapa infantil, ya que los problemas nutricionales como síndrome metabólico y obesidad son prioridades en salud. Este trabajo tiene como finalidad demostrar la eficiencia de estas fibras derivadas de una planta representativa de nuestro país, lo cual podrá

beneficiar a los grupos más vulnerables ante la problemática nutricional que enfrenta la población mexicana.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La importancia de los probióticos y prebióticos está aumentando en todo el mundo debido a sus efectos benéficos sobre la salud. El desarrollo de mejores prebióticos y probióticos genera la posibilidad de obtener resultados más eficaces en la prevención de la salud en la población. Como ya se mencionó en la sección de antecedentes, el uso de fibras dietéticas ha sido ampliamente estudiado y su seguridad y eficacia han sido demostradas en población adulta y en niños. Por otra parte, el uso de fructanos derivados del Agave como fibras dietéticas adicionadas a los alimentos, es de suma importancia en nuestro país; esto debido a que los plantíos de *Agave tequilana* Weber var. *azul* se encuentran bastante extendidos en algunas regiones de los campos mexicanos y representan un eficiente recurso natural de carácter endémico. Aunado a lo anterior, estos fructanos se caracterizan por presentar una alta solubilidad y un índice glicémico muy bajo; condiciones que los hacen altamente convenientes para adicionarlos en casi todos los alimentos. Es imperativo la toma de decisiones que conlleven a el uso de fibras dietéticas en la dieta del mexicano, principalmente desde la etapa infantil, ya que los problemas nutricionales como síndrome metabólico y obesidad son prioridades en salud. El poder demostrar la eficiencia de estas fibras derivadas de una planta representativa de nuestro país, podrá beneficiar a las poblaciones más vulnerables ante la problemática nutricional de nuestros días.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿El uso de las fibras Metlin® y Metlos® incorporadas a la fórmula infantil, es eficaz para el buen desarrollo de lactantes sanos?

Objetivos:

Objetivo General.

-Evaluar la eficacia de dos fibras derivadas del *Agave tequilana* incorporadas a la fórmula infantil de lactantes sanos.

Objetivos Específicos.

-Determinar los cambios en la microbiota intestinal mediante el análisis de los datos generados a través de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real time-PCR).

-Determinar el impacto en el metabolismo óseo mediante el análisis de los resultados obtenidos a través de la prueba de concentración deoxipiridinolina (DPD) en orina.

-Evaluar el impacto sobre el sistema inmunológico mediante el análisis de los resultados derivados de la determinación de IgA en saliva.

Hipótesis

La adición de Metlin® y Metlos® (fructanos derivados del *Agave tequilana*) a la fórmula infantil de lactantes es eficaz para el buen desarrollo de la población infantil estudiada; esto se podrá verificar al analizar el cambio en la microbiota intestinal, así como en el aumento de DPD y la concentración de IgA en saliva. Los grupos de recién nacidos que consuman estas fibras tendrán patrones de desarrollo más parecidos al grupo de lactancia materna exclusiva.

Material y Métodos

Diseño del Estudio. La presente tesis es uno de los productos de un Estudio Clínico Controlado, Aleatorizado y Doble Ciego, el cual fue aprobado por los comités de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Pediatría (No. de Registro 76/2009). Se llevó a cabo en 600 recién nacidos a término con un a edad promedio de 20 ± 7 días al momento de la inclusión al estudio. Se incluyeron

ambos sexos con peso al nacer de 2,490 g o más, con buena salud aparente al nacimiento, sin historial médico de patología materna durante el embarazo.

Tamaño de la Muestra. El tamaño de la muestra fue calculado considerando un error α de 0.05 y un error β de 0.10 y un 20% de adherencia. Se prepararon sobres sellados conteniendo la secuencia de asignación al tratamiento, los cuales se obtuvieron usando un software de asignación al azar (versión 1.0.1), a través de un proceso de bloqueo balanceado. El producto bajo investigación fue codificado con siete caracteres impresos en la parte externa de la caja. Ni el investigador, co-investigador, personal de Nekutli, ni los padres de familia fueron informados acerca de la identidad del producto de investigación. El investigador principal estaba autorizado para, de ser necesario, romper el “ciego”. La Fórmula infantil reúne los requerimientos de nutrientes para infantes a los regulatorios presentes en “The Infant Formula Act 1986”. La fórmula infantil bajo investigación contiene también un sistema prebiótico dual proveniente del Agave mexicano “Metlin® y Metlos®” (Tabla 1). Los padres fueron instruidos para administrar la fórmula *ad libitum* como la única fuente nutricional hasta la visita 4. Después de la visita 4, no hubo restricción acerca de la alimentación complementaria que los participantes pudieran recibir. En el caso de diarrea aguda o deshidratación, los participantes podrían utilizar una terapia rehidratante sin prebióticos. Se recomendó no usar ningún medicamento que pudiera modificar las variables de estudio. El proceso de asignación clasificó a los infantes en 5 grupos: Grupo 1: Fórmula adicionada con probiótico + Metlin + Metlos; Grupo 2; Fórmula adicionada con probiótico + Metlin; Grupo 3: Fórmula adicionada con probiótico + Metlos; Grupo 4; Fórmula adicionada con probiótico y Grupo 5: Fórmula sin probiótico ni prebióticos. Los bebés cuyas mamás optaron por lactancia materna exclusiva, fueron el Grupo 6 ó control.

Tabla 1. Composición de la fórmula infantil en estudio.

Ingredientes en 100ml	Probióticos + Metlin + Metios	Probióticos + Metlin	Probióticos + Metios	Sólo Probióticos	Sólo Fórmula
Energía (Kcal)	53	53	53	53	53
Proteínas (g) (75% suero)	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
Grasas (g) (42% g/irasol; 30% coco; 28% soya)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Carbohidratos (g)	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Metlin® (g)	0.2	0.5	0.0	0.0	0.0
Metios® (g)	0.3	0.0	0.5	0.0	0.0
Nucleótidos (mg)	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
Lactobacillus GG (UFC) 10⁷	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0
DHA* (g)	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
AA** (g)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03

* DHA: Ácido Docosahexanoico; ** Ácido Araquidónico

Criterios de Inclusión

1. El médico pediatra considera, después de la revisión física, que el lactante goza de buena salud aparente y está libre de cualquier enfermedad infecciosa aguda.
2. El lactante es considerado nacido a término, de cualquier género, con una edad de gestación de 37 a 42 semanas según el reporte del padre/madre.
3. El lactante tiene ≤ 27 días de edad (la fecha de nacimiento es el día 0 de vida, por lo que Días de Edad = la fecha de reclutamiento menos la fecha de nacimiento).
4. El lactante tuvo un peso al nacer de 2490 g (~ 5 lb 8 oz) o más, según el reporte del padre/madre.
5. Se considera que el lactante puede tolerar una fórmula basada en leche de vaca.

6. El padre/la madre o el tutor legal se ha comprometido a no administrar alimentos sólidos ni jugos a su bebé antes de la Visita 4, a menos que su profesional de la salud le indique lo contrario.
7. El padre/la madre o el tutor legal se ha comprometido a no administrar suplementos vitamínicos ni minerales, remedios caseros, preparados herbales ni medicamentos que puedan afectar la evaluación de la tolerancia a la fórmula, a menos que su profesional de la salud le indique lo contrario.
8. El padre/la madre o el tutor legal se compromete a cumplir con el diseño del estudio, que incluye regresar con su bebé para las visitas designadas del estudio.
9. El padre/la madre o el tutor legal se compromete a devolver todo el producto no abierto al investigador.
10. El padre/la madre o un tutor legal de manera voluntaria ha firmado y fechado un formulario de consentimiento informado aprobado por un Comité de Ética Independiente/Consejo de Revisión Institucional (CEI/CRI) antes de cualquier participación en el estudio.

Criterios de Exclusión:

1. El lactante muestra evidencia clínica de enfermedad cardíaca, respiratoria, gastrointestinal, hematológica o metabólica o tiene alergia a la proteína de la leche de vaca.
2. El lactante tiene un historial médico materno de diabetes (la diabetes gestacional es aceptable si el peso del bebé al nacer es igual o inferior al percentil 95. 4153 g o 9 lbs 3 oz para niñas y 4340 gr o 9 lbs 9 oz para niños), tuberculosis, deficiencias inmunológicas, enfermedad infecciosa o infecciones perinatales que se sabe ocasionan efectos adversos en el feto.

3. Participación en otro estudio que no haya sido aprobado como estudio concomitante por el INPed o Nektli.
4. El padre/la madre o el tutor legal no puede leer o comprender el formulario de consentimiento informado.
5. El investigador considera que el lactante o los padres o el tutor legal del lactante no seguirán los procedimientos del estudio o que el lactante no es apropiado para el estudio.
6. El lactante es producto de parto múltiple (mellizos, trillizos, etc.).

El proceso de asignación clasificó a los infantes en 5 grupos: Grupo 1: Fórmula adicionada con probiótico + Metlin + Metlos; Grupo 2; Fórmula adicionada con probiótico + Metlin; Grupo 3: Fórmula adicionada con probiótico + Metlos; Grupo 4; Fórmula adicionada con probiótico y Grupo 5: Fórmula sin probiótico ni prebióticos. Los bebés cuyas mamás optaron por lactancia materna exclusiva, fueron el Grupo 6 ó control.

Los bebés fueron evaluados mensualmente, hasta que alcanzaron los 6 meses de edad. Las variables de estudio primarias incluyeron la frecuencia de evacuaciones, consistencia de evacuaciones, intolerancia gastrointestinal, (frecuencia de distensión abdominal, flatulencia, regurgitaciones, vómito). Esto demostró la seguridad del estudio. Las variables de estudio secundarias incluyeron los cambios en el peso y la altura, IgA de saliva y metabolismo óseo a lo largo del estudio.

Análisis Estadístico. Todos los datos disponibles de los participantes fueron incluidos en un análisis intencionado (Intention To Treat Analyses; ITT) usando STATA para Mac, versión 11. Las variables al momento de la admisión fueron contrastadas por Chi cuadrada, ANOVA o prueba de Kruskal Wallis. Las variables de salida fueron también comparadas con Chi cuadrada para

variables categóricas o por ANOVA o prueba de Kruskal Wallis para las variables numéricas. Cuando fue necesario, se llevó a cabo ajuste por covariados con ANCOVA o a través de regresión logística para variables categóricas. Se consideró como significativo un valor de $p \leq 0.05$.

Metabolismo Óseo.

Se hicieron dos colectas de orina para cada paciente, una al inicio del estudio y otra al final del mismo. Se utilizaron pañales libres de químicos con bolsas estériles colectoras de orina. Las muestras fueron ultracongeladas a -70°C hasta que fueron procesadas. Para analizar la reabsorción ósea, medimos la deoxipiridinolina (DPD) excretada; esto mediante el uso de inmunoensayos utilizando el kit MicroVue DPD EIA kit (Quidel Corp.).

Aislamiento de ADN a partir de heces

Se tomaron dos muestras de heces de cada paciente en la primera y la última visitas. Para evitar contaminación por parte de los padres al momento de tomar la muestra, se utilizaron pañales libres de químicos, los cuales fueron colocados en el momento de llegar a la consulta pediátrica previamente programada. Inmediatamente después de colectadas las muestras, fueron enfriadas en hielo y procesadas con el kit QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen), de acuerdo a las instrucciones del producto (Penders et al., 2010). Las muestras de ADN fueron eluidas en un volumen final de $100 \mu\text{L}$.

Análisis cuantitativo de las bacterias presentes en las heces mediante PCR en tiempo real.

El PCR en tiempo real se llevó a cabo en 148 muestras, las cuales representaban el antes y el después de cada uno de los 5 grupos de tratamiento y el grupo control. El ADN previamente aislado se sometió a ensayos de PCR en tiempo real con el método 5'-nucleasa (TaqMan) y usando sondas fluorogénicas para la secuencia del gen de ADNr 16S de *Bifidobacterium* spp (Haarman & Knol, 2005), *Enterobacteriaceae* (Gronlund et al., 1999), *Lactobacillus* spp. (Haarman & Knol, 2006);

Clostridium Cluster XI (Nakamura et al., 2009) and total bacteria (Nadkarni et al., 2002). Los ensayos TaqMan para *Veillonella* spp y *Bacteroides fragilis* fueron diseñados por nuestro grupo de trabajo (primers y sondas se enlistan en la Tabla 2).

Para verificar la especificidad y la concentración óptima de trabajo con los primers, utilizamos ADN de las siguientes cepas de referencia: *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285D, EN-2), *Escherichia coli* (ATCC 700928D-5, CFT073), *Clostridium difficile* (ATCC BAA-1382D-5, 630), *Shigella flexneri* (ATCC 700930D-5, 2457T), *Bifidobacterium adolescentis* (ATCC 15703D, E194a Variante a), *Bifidobacterium breve* (ATCC 15700D-5, S1 Variante a), *Bifidobacterium infantis* (ATCC 15697D-5, S12), *Lactobacillus casei* (ATCC 334D-5, ATCC 334™), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4357D-5, Pak), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ATCC 11842D-5, Lb14), *Veillonella parvula* (ATCC 10790D-5, Te 3) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 700802D-5, V583). Las curvas estándares para cada especie fueron analizadas dentro de un rango dinámico (0.32 to 1,000 pg de referencia para ADN bacterial genómico) con propósito de cuantificación relativa.

Todas las reacciones se realizaron por triplicado en un volumen final de 25 µL, conteniendo 1X TaqMan Universal PCR Master Mix con uracil-DNA glycosylase (Applied Biosystems, Foster city, CA), 500 nM/L de ambos primers y 250 nM de cada sonda TaqMan y 500 pg de ADN bacteriano purificado. La amplificación fue con las siguientes condiciones: 2 minutos a 50° C, 95° C por 10 min and 40 ciclos de 95° C 20s y 1 minuto a 60° C. La detección de la fluorescencia y el análisis fueron llevados a cabo en un equipo Applied Biosystems 7000 Real-time PCR System (Applied Biosystems).

TABLA 2 Primers y Sondas Utilizadas en este Estudio

Organismos (Tamaño Amplicon)	Primer/Sonda	Secuencia (5' a 3')	T _m , °C	Referencia
<i>Bifidobacterium</i> spp (231 pb)	Forward primer	GGGATGCTGGTGTGGAAGAGA	60	Haarman & Knol, 2005
	Reverse primer	TGCTCGCGTCCACTATCCAGT	60	
	Sonda	VIC-TCAAACCACCACGGCCCA-NFQ-MGB	70	
<i>Enterobacteriaceae</i> (96 pb)	Forward primer	CATGCC GCGTGTATGAAGAA	59	Huijsdens et al., 2002
	Reverse primer	CGGGTAACGTCAATGAGCAA	59	Huijsdens et al., 2002
	Sonda	6-FAM-TATTAACTTTACTCCCTTCCTCCCGCTGAA-TAMRA	68	Huijsdens et al., 2002
<i>Lactobacillus</i> spp (92 pb)	Forward primer	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	58	Haarman & Knol, 2006
	Reverse primer	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTTAT	58	
	Sonda	VIC-TATTAGTTCCGTCCTTCATC-NFQ-MGB	68	
<i>Clostridium</i> Cluster XI (139 pb)	Forward primer	ACGCTACTT GAGGAGGA	58	Nakamura et al., 2009
	Reverse primer	GAGCCG TAG CCT TTC ACT	58	
	Sonda	6-FAM-GTGCCAGCAGCCGCGTAATACG-TAMRA	63	
<i>Bacteroides fragilis</i> (99 pb)	Forward primer	CTACAGGCTTAACACATGCAAGTC	54	Este Estudio
	Reverse primer	GCAGGTTGGATACGTGTTACTCA	54	Este Estudio
	Sonda	6-FAM-TCGCCAGCAAAGAAA-NFQ-MGB	64	Este Estudio
<i>Veillonella</i> spp (128 pb)	Forward primer	ATCAACCTGCCCTTCAGAGG	54	Este Estudio
	Reverse primer	AATCCCCTCCTTCAGTGATAGCTTA	54	Este Estudio
	Sonda	6-FAM-TAGCAGTCGTTCCAAGTGT-NFQ-MGB	68	Este Estudio
Total Count (467 pb)	Forward primer	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	59	Nadkarni et al., 2002
	Reverse primer	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	58	Nadkarni et al., 2002
	Sonda	6-FAM-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-BHQ1	70	Nadkarni et al., 2002

T_m indica la temperatura de alineación; pb, pares de bases.

Determinación de IgA en saliva.

La concentración o presencia de la IgA puede determinarse mediante varios métodos, uno de ellos es el ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) por sus siglas en ingles, el cuál ha demostrado ser de una alta sensibilidad y especificidad para otros antígenos y anticuerpos, por ejemplo, se han realizado estudios para detectar anticuerpos de clase IgA e IgG contra *Toxoplasma gondii* en saliva y suero de pacientes humanos.

La mejor forma de realizar esta medición es por medio de la captura de la IgA a través de una anti-IgA humana ligada a una enzima (peroxidasa), la cuál reacciona con el peróxido de hidrógeno ocasionando una reacción colorimétrica que puede medirse mediante espectrometría con luz UV a 490 nm y con esto medir la concentración.

Para realizar el ensayo se requiere tener controles positivos: saliva de seres humanos con IgA y negativos: saliva sin IgA o con baja concentración de esta para poder realizar la diferenciación entre casos positivos y negativos. La mejor forma de obtener los controles es usando una prueba secundaria, en este caso un kit comercial de ELISA para determinación de IgA, y probando con las muestras a analizar, una vez realizado esto se puede montar el experimento de manera “casera”. Una vez que se tienen los controles, se necesita determinar las diluciones óptimas de antígeno (saliva), anticuerpo de captura (anti-IgA humano), conjugado (anti-IgA humano unido a peroxidasa) y del cromógeno sustrato con el cual va a reaccionar la peroxidasa para medir la absorbancia en un espectrómetro y poder realizar el ensayo final para obtener los resultados requeridos.

Ya que el objetivo del estudio fue comparar la variación en la concentración de esta IgA entre una muestra con niveles basales y una colectada tiempo después, se realizaron 4 diluciones de cada muestra y con ello se generaron curvas de concentración para así poder comparar las muestras basales y las posteriores (seis meses después) y poder así verificar si hubo cambios en la concentración de esta inmunoglobulina.

Resultados.

La figura 2 muestra de manera esquemática la estrategia de reclutamiento e inclusión de los participantes en el estudio. De los 937 pacientes elegibles, 187 (20%) tuvieron al menos un criterio de exclusión. En 150, los padres no aceptaron participar en el estudio. La muestra final estuvo conformada por 600 pacientes.

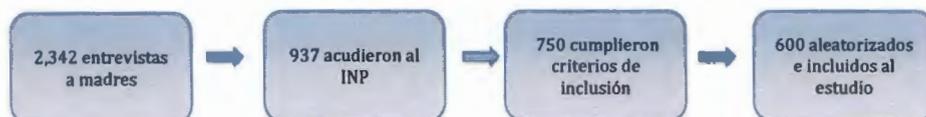


Fig. 2. Diagrama de flujo del reclutamiento e inclusión de pacientes

No se observaron diferencias significativas entre los grupos con relación a la edad al momento de su entrada al estudio. Tampoco hubo diferencias significativas en cuanto a la distribución por género, edad gestacional, APGR, o peso y talla al nacimiento (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de variables epidemiológicas al ingreso al estudio

Variable	Grupo Probióticos + Metlin + Metlos (n=93)	Grupo Probióticos + Metlin (n=93)	Grupo probióticos + Metlos (n=89)	Grupo Probióticos (n=89)	Grupo sólo Fórmula (n=89)	Grupo Lactancia Materna (n=147)
Edad [días] (x ± d.s.)	14.2 ± 6.3	14.0 ± 4.2	14.6 ± 6.4	14.8 ± 6.5	14.0 ± 5.8	14.8 ± 5.2
Género	44.6	46.4	57.4	59.3	55.6	53.9
Masculino (%)						
Edad Gestacional (x ± d.s.)	38.6 ± 1.5	38.1 ± 5.4	39.0 ± 1.3	37.2 ± 7.5	38.9 ± 1.4	38.4 ± 4.3
[APGAR] (x ± d.s.)	8.9 ± 0.29	9.0 ± 0.20	8.9 ± 0.33	8.8 ± 0.44	8.9 ± 0.36	8.9 ± 0.36
Peso al Nacer [g] (x ± d.s.)	3,102 ± 341	3,041 ± 407	3,087 ± 352	3,015 ± 405	2,997 ± 378	3,038 ± 409
Talla al Nacer [cm.] (x ± d.s.)	49.4 ± 7.0	48.9 ± 6.9	47.9 ± 9.8	49.1 ± 2.3	49.4 ± 2.1	48.3 ± 7.7

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; Si no se especifica, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Efecto en la respuesta inmune. Se hizo un análisis exploratorio de la inmunidad de los niños en el estudio mediante la determinación de los niveles de IgA en saliva, identificándose diferencias

estadísticamente significativas para los infantes del grupo de alimentado con la fórmula enriquecida con Metlin® y Metlos®. El incremento de la concentración de IgA con respecto al inicio del estudio y el final del mismo, se muestran en la figura 3.

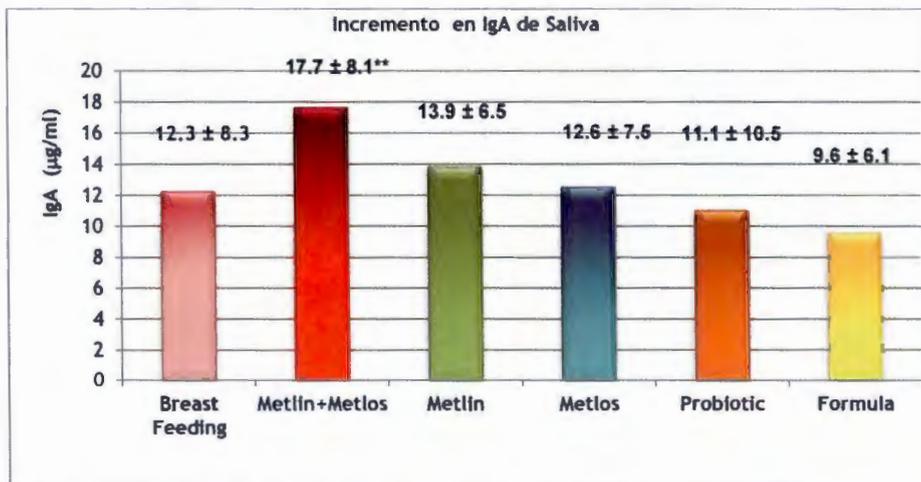


Figura 3. Incremento de IgA en saliva de los niños con diferente alimentación. ** Diferencia significativa con $p < 0.05$.

Impacto en el Metabolismo Óseo. La concentración de DPD se determinó en muestras de orina tomadas de la primera y la última visita al centro de estudio. El promedio del incremento para cada grupo se muestra de manera gráfica en la figura 4. Como era de esperarse, los niños alimentados exclusivamente con leche materna, tuvieron un incremento significativo en la concentración de DPD con respecto a los demás grupos. Por otra parte, los niños alimentados con fórmula únicamente, tuvieron el menor de los incrementos. De manera interesante, los niños alimentados con la fórmula adicionada con probióticos + Metlin + Metlos fueron los que tuvieron el mayor incremento en DPD, indicando que su metabolismo óseo se encuentra en muy buenas condiciones.

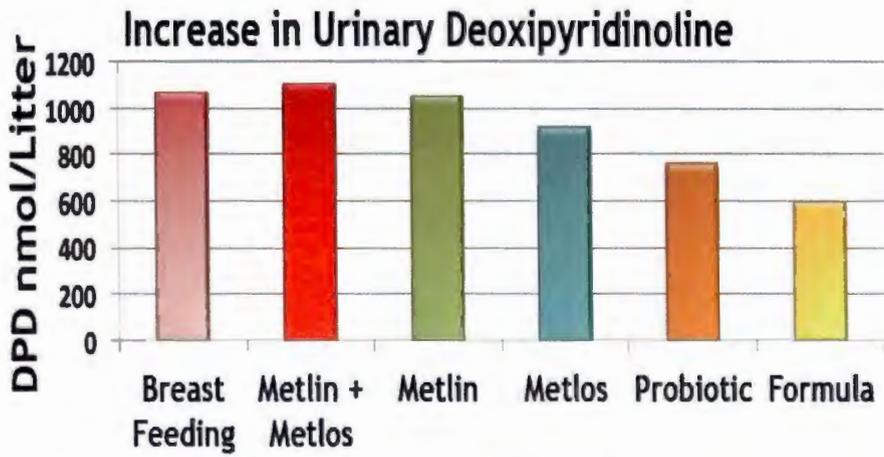


Figura 4. Cambios en los niveles de DPD en los diferentes grupos de estudio

Cambios en la microbiota intestinal. Debido a la complejidad del proceso de colecta de heces de los pacientes (esta se hizo al momento de su revisión clínica), solo pudimos colectar 600 muestras de heces; de ellas, 480 tuvieron la suficiente calidad para aislar ADN y 300 de ellas fueron de pacientes que completaron todas sus visitas. De estas últimas, 148 muestras fueron analizadas por real-time PCR. La Figura 5 muestra los resultados del análisis por tiempo real del antes (azul) y después del tratamiento con respecto a diferentes grupos de bacterias que se han descrito en la microbiota intestinal de varias poblaciones.

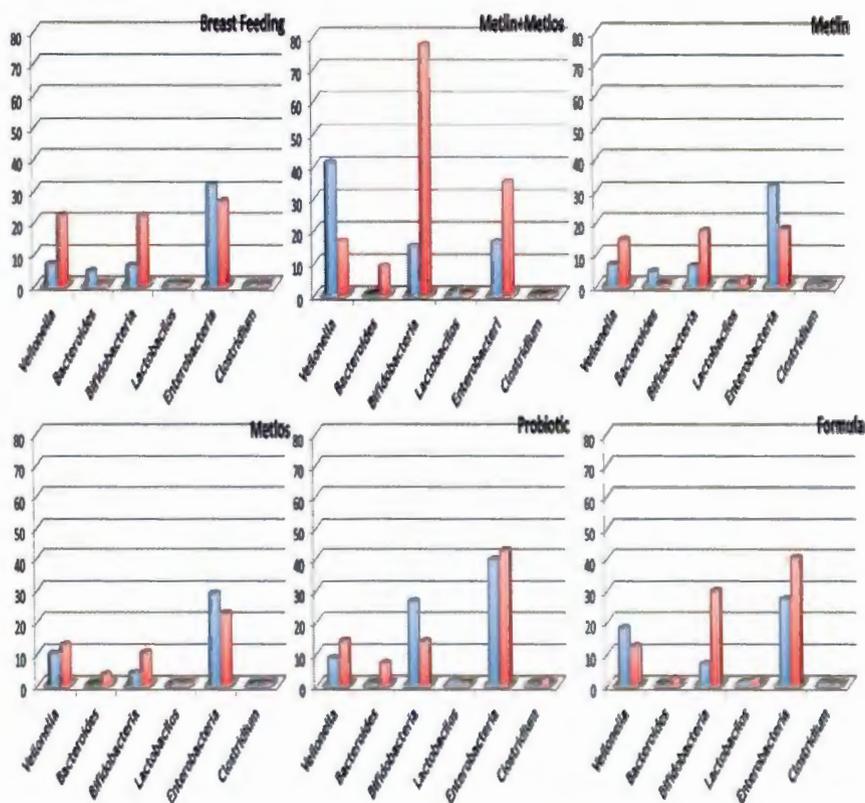


Figura 5. Análisis por real-time PCR de los diferentes grupos de estudio. Azul: muestras tomadas al inicio del estudio; Rojo: muestras tomadas al final del estudio.

Aunque los resultados de real-time PCR no son contundentes (ya que se sabe que las variaciones también pueden estar relacionadas con cada individuo), a grandes rasgos se puede mencionar que, la combinación Metlin + Metlos es la que tiene un mayor efecto bifidogénico. Este efecto se presenta en todos los grupos, excepto en el de fórmula+probióticos. En los grupos que tienen Metlin o Metlos por separado, al igual que en el grupo de lactancia materna, se ve una disminución de Enterobacterias. Extrañamente, esto no se observa en el grupo Metlin+Metlos. También es de llamar la atención que en ningún grupo se ve favorecido el crecimiento de Lactobacilos, a pesar de

que las formulas iban adicionadas con *Lactobacillus* GG como probiótico. En los únicos grupos en que se redujeron los bacteroidetes fue en el de lactancia materna y en el que tenía Metlin.

Discusión

Es sabido que el proceso de colonización bacteriana a nivel del intestino empieza desde el nacimiento (se conoce como la fase 1 de la colonización bacteriana), justo en el momento que el producto deja el ambiente intrauterino. Después de esto, el intestino continúa su colonización durante la etapa de lactancia, la cual puede ser mediante alimentación a base de seno materno o mediante fórmulas enriquecidas con probióticos (fase 2 de la colonización), este proceso continúa hasta la ablactación (fase 3 de la colonización).

La microbiota intestinal de los lactantes amamantados tiene un papel primordial en la función intestinal y en el desarrollo del sistema inmune. Los oligosacáridos presentes en la leche materna estimulan selectivamente el crecimiento de Bifidobacterias y Lactobacilos en el intestino. En los últimos años se han realizado varios intentos para obtener una microbiota similar en lactantes alimentados con fórmulas infantiles. Una de las posibilidades para obtener este efecto es proporcionar nutrientes selectivos para esta microbiota beneficiosa (prebióticos).

Para el caso del presente trabajo, se pudo demostrar la efectividad del uso de Metlin® y Metlos® adicionados a la fórmula infantil ya que las IgAs de saliva de los grupos que consumieron los fructanos en cuestión siempre estuvieron por encima de los valores obtenidos en el grupo de lactantes que solo consumieron formula, e inclusive por encima del grupo que consumió la fórmula adicionada con probióticos (ver Fig. 3); por lo tanto, el consumo de estos fructanos derivados del Agave resulta en beneficio del recién nacido ya que estimula su sistema inmune. Es de llamar la atención que el grupo que consumió la mezcla Metlin® + Metlos® + probióticos tuvo el mayor incremento en IgAs, con diferencia significativa al comparar contra los demás grupos, incluso

aquellos alimentados por seno materno. Esto de ninguna manera quiere decir que la fórmula adicionada sea mejor que la alimentación materna, no obstante puede ser un indicio de la mala nutrición y falta de consumo de fibras por parte de las madres mexicanas en estudio.

El remodelamiento óseo es un proceso que involucra el crecimiento y el recambio óseo y ocurre principalmente en la superficie endosteal (Dempster, 2002). En el desarrollo y crecimiento óseo del niño hay dos procesos involucrados: la osificación intramembranosa (huesos planos) y la osificación endocondral (metáfisis de huesos largos) (Baron, 1999). El recambio óseo en el niño es mayor que en el adulto, aproximadamente 10 veces mayor en un neonato y 6 veces mayor en el escolar. Por este motivo un niño puede perder y recuperar masa ósea más rápidamente que el adulto (Gertner, 1999). La piridinolina y la deoxipiridinolina (DPD) son aminoácidos no reducibles que unen entre sí las fibras de colágeno maduro. Se encuentran en la matriz del hueso y del cartílago.

El colá

hélice, con fibras conectadas por *cross links* entre residuos de lisina e hidroxilisina que unen extremos carboxi y amino terminales no helicoidales de una molécula de colágeno, con una porción helicoidal de una molécula adyacente. La DPD es un marcador de resorción ósea más específico y sensible debido a 1) Se forma durante la maduración del colágeno, 2) Se origina sólo como producto de degradación de la matriz ósea, 3) El hueso es su mayor origen y, 4) No está influenciada por la dieta.

Para el caso de los neonatos, los niveles de DPD son un reflejo de la actividad del metabolismo de recambio del hueso y los resultados obtenidos en este estudio muestran mayores niveles de DPD en el grupo de bebés alimentados por seno materno. Aquellos grupos que consumieron fórmula adicionada con los fructanos Metlin y Metlos tuvieron niveles de DPD más parecidos a los del grupo de lactancia materna. Por otra parte, los que fueron alimentados solo con fórmula o fórmula y probióticos únicamente, mostraron los niveles de DPD más bajos (ver Fig. 4). Estos resultados nos

sugieren que el metabolismo óseo se ve favorecido en el grupo de lactancia materna y en los grupos que consumieron Metlin y Metlos, siendo este un indicio más de la eficacia de ambos fructanos.

Debe hacerse notar que la microbiota intestinal varía de individuo a individuo y los cambios en ella, dependiendo de la alimentación y el estilo de vida, pueden verificarse a partir incluso de los primeros 15 días de tratamiento (Ramírez-Farías, et al., 2009). También se presenta respuesta diferencial entre individuos a pesar de consumir el mismo tipo de fibras. Los resultados del presente trabajo muestran en términos generales que la adición de Metlin o Metlos o la combinación de ambos a la alimentación del recién nacido, deriva en un efecto bifidogénico variado. Como ya es sabido, el grupo de bebés alimentados a seno materno muestra un incremento en la población de Bifidobacterias con respecto al nacimiento y después de los seis meses de alimentación (Fig. 5, panel Breast Feeding); el mayor efecto bifidogénico se observa en el grupo de bebés alimentados con formula+probiótico+Metlin+Metlos (Fig. 5 panel Metlin+Metlos). En todos los grupos que incluyeron fructanos en la fórmula se observó algún grado de efecto bifidogénico. No obstante, también el grupo de fórmula sola mostró aumento en la población de bifidobacterias con respecto a la población bacteriana total (Fig. 5 panel Formula) y en el grupo de fórmula únicamente con probiótico hubo disminución del grupo de bifidobacterias (Fig. 5 panel Probiotic). Por otra parte, en el grupo alimentado con fórmula o fórmula+probiótico, se observa un aumento en la población de Enterobacterias (grupo de bacterias patógenas), a diferencia del resto de los grupos que muestran una disminución de este tipo de bacterias. Llama la atención que en el grupo alimentado con formula+probiótico+Metlin+Metlos, hay un aumento en la proporción de este grupo de bacterias patógenas. Haciendo un análisis de este efecto se observó que, en términos de cantidad de ADN de estas bacterias, hay una reducción en el antes y el después del consumo de Metlin+Metlos y el aumento se ve cuando se hace grafican los porcentajes de ADN relativos a la población bacteriana completa (Fig. 5). El siguiente gráfico muestra este comportamiento.

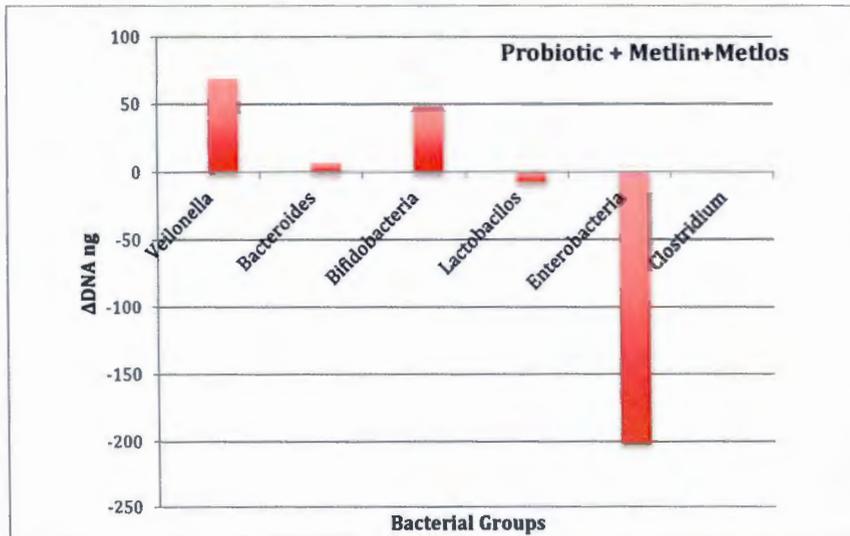


Figura 6. Cambios en la concentración de ADN bacteriano en el grupo alimentado con fórmula adicionada con probiótico, Metlin y Metlos.

El estudio por PCR en tiempo real muestra, en términos generales, la eficacia del uso de fructanos derivados del Agave para favorecer el crecimiento de bacterias benéficas y frenar el desarrollo de bacterias patógenas en el grupo de recién nacidos mexicanos que participaron en este estudio.

Es importante notar que algunos aspectos relacionados con los beneficios de la lactancia materna no son muy obvios y en ocasiones están por debajo de los niveles encontrados en los grupos que consumieron Metlin o Metlos. Se sabe que existen más de 130 oligosacáridos (con ≥ 3 monosacáridos) en conjunto con fructanos tipo inulina presentes en la leche materna humana; su estructura molecular y concentración es altamente variable, dependiendo principalmente de las diferencias genéticas (Boehm y Moro, 2008; Forchielli y Walke, 2005), pero también debe influir la alimentación de la madre antes y durante el periodo de lactancia.

Por estas razones es que se necesita de un estudio más detallado con respecto a la composición de la leche materna de madres mexicanas, así como del impacto que pueda tener en la salud del recién nacido el consumo de Metlin y Metlos por parte de la madre durante el embarazo y la lactancia.

Conclusiones: Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten apoyar el uso de fructanos derivados del Agave como prebióticos eficaces, con impacto significativo en la proliferación de la microflora intestinal benéfica, sobre el metabolismo óseo mineral, así como en el sistema inmune del recién nacido a término.

Referencias.

1. AACC. American Association of Cereal Chemists. AACC Report. The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World* 2001; 46:112-29.
2. Alexander JW (1995) Specific nutrients and the immune response. *Nutrition* 11, 229–232.
3. Baron R. Anatomy and ultrastructure of bone. En: **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. Favus MJ eds. 4th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 1999; 3-10.
4. Berg RD (1985) Indigenous intestinal microflora and the host immune response. *EOS Journal of Immunology and Immunopharmacology* 4, 161–168.
5. Boehm G, Moro G. Structural and functional aspects of prebiotics used in infant nutrition. *J Nutr* 2008;138:S1818-28.
6. Bouhnik Y, Flourie B, Riottot M, Bisetti N, Gailing M-F, Guibert A, Bornet F & Rambaud J-C (1996) Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. *Nutrition and Cancer* 26, 21–29.
7. Buddington RK, Williams CH, Chen S-C & Witherly SA (1996) Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 63, 709–716.
8. Cummings JH, Mann JI, Nishida C, Vorster HH. Dietary fibre: an agreed definition. *Lancet*. 2009 Jan 31;373(9661):365-6.
9. de Graaf AA, Venema K. Gaining insight into microbial physiology in the large intestine: a special role for stable isotopes. *Adv Microb Physiol*. 2008;53:73-168.
10. De Simone C, Vesely R, Negri R, Bianchi Salvadori B, Zanzoglu S, Cilli A & Lucci L (1987) Enhancement of immune response of murine Peyer's patches by a diet supplemented

- with yogurt. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 9, 87–100.
11. De Simone C, Grassi PP, Bianchi Salvadori B, Miragliotta G, Vesely R & Jirillo E (1988) Adherence of specific yogurt microorganisms to human peripheral blood lymphocytes. *Microbios* 55, 49–57.
 12. Deitch EA, Xu D, Lu Q & Berg R (1993) Elemental diet-induced immune suppression is caused by both bacterial and dietary factors. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 17, 332–336.
 13. Dempster D. Bone remodeling. En: **Disorders of bone and mineral metabolism**. Coe F, Favus M. eds. 2th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2002; 315–43.
 14. Flamm G, Glinsmann W, Kritchevsky D, Prosky L, Roberfroid M. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2001 Jul;41(5):353-62.
 15. Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr*. 2005 Apr;93 Suppl 1:S41-8.
 16. Franck A. Technological functionality of inulin and oligofructose. *Br J Nutr*. 2002 May;87 Suppl 2:S287-91.
 17. Frankel W, Zhang W, Singh A, Bain A, Satchithanandam S, Klurfeld D & Rombeau J (1995) Fiber: effect on bacterial translocation and intestinal mucin content. *World Journal of Surgery* 19, 144–149.
 18. Gertner M. Childhood and adolescence. En: **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. Favus MJ eds. 4th Ed. 1999; 45-9.
 19. Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401–1412.
 20. Kelly G. Inulin-type prebiotics--a review: part 1. *Altern Med Rev*. 2008 Dec;13(4):315-29.
 21. Kleesen B, Sykura B, Zunft H-J & Blaut M (1997) Effects of inulin and lactose on fecal

- microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *American Journal of Clinical Nutrition* 65, 1397–1402.
22. Link-Amster H, Rochat F, Saudan KY, Mignot O & Aeschlimann JM (1994) Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 10, 55–64.
23. López-Velázquez G, Díaz-García L, Anzo A, Parra-Ortiz M, Llamosas-Gallardo B, Ortiz-Hernández AA, Mancilla-Ramírez J, Cruz Rubio JM, Gutiérrez-Castrellón P. (2013). Safety of a dual prebiotic system from Mexican Agave “Metlin® and Metlos®”, incorporated to an infant formula for term newborn babies: a randomized controlled trial (RCT-NCT 01251783). *Rev Inv Clin*. En prensa.
24. Madrigal L, Sangronis E. Inulin and derivatives as key ingredients in functional foods. *Arch Latinoam Nutr*. 2007 Dec;57(4):387-96.
25. Matsuzaki T (1998) Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *International Journal of Food Microbiology* 41, 133–140.
26. Menne E, Guggenbuhl N & Roberfroid MB (2000) Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effect in humans. *Journal of Nutrition* 130, 1197–1199.
27. Meyer D, Tunland B. The benefits of the dietary fibre.(2002) *Tecnifood* 23, 68-71.
28. Meyer D, Stasse-Wolthuis M. The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *Eur J Clin Nutr*. 2009 Nov;63(11):1277-89.
29. Mitsuoka T, Hidaka H & Eida T (1987) Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal microflora. *Nahrung* 31, 427–436.
30. Niness KR. Inulin and oligofructose: what are they? *J Nutr*. 1999 Jul;129(7 Suppl):1402S-6S.

31. Perdigon G, Nader de Macias ME, Alvarez S, Oliver G & Pesce de Ruiz Holgado A (1988) Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology* 63, 17–23.
32. Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z, Duncan A, Holtrop G, Louis P. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br J Nutr.* 2009 Feb;101(4):541-50.
33. Roberfroid MB. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *J Nutr.* 1999 Jul;129(7 Suppl):1398S-401S.
34. Roberfroid MB. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr.* 2007 Nov;137(11 Suppl):2493S-2502S.
35. Ruthlein J, Heinze G & Auer IO (1992) Anti-CD2 and anti-CD3 induced T cell cytotoxicity of human intraepithelial and lamina propria lymphocytes. *Gut* 33, 1626–1632.
36. Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM & Donnet-Hughes A (1995) Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 78, 491–497.
37. Slavin JL. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc.* 2008 Oct;108(10):1716-31.
38. Solis Pereyra B & Lemonnier D (1993) Induction of human cytokines by bacteria used in dairy foods. *Nutrition Research* 13, 1127–1140.
39. Spaeth G, Gottwald T, Specian RD, Mainous MR, Berg RD & Deitch EA (1994) Secretory immunoglobulin A, intestinal mucin, and mucosal permeability in nutritionally induced bacterial translocation in rats. *Annals of Surgery* 220, 798–808.
40. Takahashi T, Nakagawa E, Nara T, Yajima T & Kuwata T (1998) Effects of orally ingested *Bifidobacterium longum* on the mucosal IgA response of mice to dietary antigens.

Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 62, 10–15.

41. Tejada-Simon MV, Ustunol Z & Pestka JJ (1999) Ex vivo effects of lactobacilli, streptococci, and bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model. *Journal of Food Protection* 62, 162–169.
42. Trowell H. Definition of dietary fiber and hypotheses that it is a protective factor in certain diseases. *Am J Clin Nutr.* 1976 Apr;29(4):417-27
43. Xu D, Lu Q & Deitch EA (1998) Elemental diet-induced bacterial translocation associated with systemic and intestinal immune suppression. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 22, 37–41

I N P
CENTRO DE INFORMACION
Y DOCUMENTACIÓN