



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**EFFECTO DE LA INULINA SOBRE LA FLORA MICROBIANA EN EL PERIODO DE
RECUPERACIÓN DE RATAS DESNUTRIDAS**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.A. ARGELIA SÁNCHEZ CHINCHILLAS



TUTOR: DRA. HELGI JUNG COOK

AÑO:2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Profesora Emérita Ángela Sotelo López[‡] por ser ante todo una mujer excepcional. Gracias por cada momento que convivimos, por sus valiosas enseñanzas y por hacerme partícipe del apasionante mundo de la investigación y la docencia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente.

A la Dra. Helgi Jung Cook por su apoyo incondicional en la realización de esta investigación.

A los miembros del Jurado por su dedicación e interés mostrados en la revisión del manuscrito.

A la Maestra Guadalupe Tsuzuki Reyes y a la Dra. Iliana González Hernández por sus sugerencias en el planteamiento experimental.

A la Q.A. Tania Gómez Sierra por su colaboración en la fase final del ensayo biológico.

Al proyecto PAPIIT IN203008 "Influencia de la inulina en el tiempo de recuperación y desaparición de los cambios bioquímicos y estructurales producidos en ratas jóvenes desnutridas" por los fondos otorgados para el desarrollo experimental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Con profundo cariño y admiración a Ángela Sotelo y a mi familia.

Este proyecto se desarrolló en el Laboratorio 111 del Departamento de Farmacia,

Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

Parte de los resultados obtenidos fueron presentados en el

XV Congreso Latinoamericano de Nutrición.

Santiago de Chile, Noviembre 2009.

ÍNDICE TEMÁTICO

	Página
Resumen	1
Introducción	2
1. Generalidades	
1.1. Desnutrición energética proteínica (DEP)	4
1.1.1. Clasificación de la DEP	5
1.1.1.1 Clasificación de la DEP grave	7
1.1.1.2. Modificaciones fisiopatológicas de la DEP	9
1.1.2. Ciclo desnutrición-infección	10
1.1.3. Protocolos para el manejo de desnutrición	11
1.2. Flora microbiana intestinal	13
1.2.1. Efecto benéfico de la flora microbiana intestinal	15
1.3. Prebióticos	16
1.3.1. Mecanismos de prebiosis	18
1.3.2. Inulina	20
1.3.2.1. Incidencia en la naturaleza	21
1.3.2.2. Propiedades funcionales	23
1.3.2.3. Propiedades nutricionales	24
1.3.2.4. Tolerancia en el organismo	27
2. Hipótesis	28
3. Objetivos	29
4. Parte Experimental	30
4.1. Ensayo biológico	31
4.1.1. Dietas	31
4.1.2. Diseño del ensayo biológico	34
4.1.3. Parámetros de crecimiento y aprovechamiento de alimento	35
4.2. Análisis de las muestras de sangre y heces	36
4.2.1. Obtención de las muestras	36
4.2.2. Cuantificación de proteínas plasmáticas por el método de	

Lowry.	37
4.2.3. Análisis microbiológico de heces	39
4.2.3.1. Cuantificación de lactobacilos, enterobacterias y anaerobios totales por cuenta en placa	41
4.2.3.2. Cuantificación de bifidobacterias por el método del número más probable	42
4.3. Análisis Estadístico	43
5. Resultados y discusión	
5.1. Ensayo biológico	45
5.1.1. Fase I. Desarrollo del cuadro de desnutrición	45
5.1.2. Fase II. Recuperación de los grupos desnutridos y mantenimiento de los grupos testigo	49
5.2. Análisis microbiológico	57
6. Conclusiones	61
7. Perspectivas	62
Referencias	63
Anexo A. Crecimiento en placa y en tubo de los grupos de microorganismos estudiados	71
Anexo B. Tabla NMP	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.		Página
1.	Valores de referencia para indicadores del estado nutricional del niño menor de 5 años	7
2.	Características representativas de los tipos de DEP grave	8
3.	Principios generales del tratamiento sistemático propuesto por la OMS	11
4.	Oligosacáridos prebióticos	17
5.	Contenido promedio de inulina en diferentes especies vegetales	21
6.	Proveedores nacionales de inulina	23
7.	Propiedades funcionales de la inulina y sus derivados	24
8.	Estudios en humanos del efecto prebiótico de inulina	26
9.	Composición de las dietas empleadas durante el período de desnutrición (g/kg)	32
10.	Composición de las dietas empleadas en el período de recuperación (g/kg)	33
11.	Diluciones utilizadas para la cuenta en placa	42
12.	Condiciones de incubación de microorganismos	42
13.	Diluciones empleadas para el método del Número Más Probable	43
14.	Velocidad de crecimiento (VC) y peso corporal al inicio y al final de la de la fase I	47
15.	Eficiencia de conversión alimenticia (ECA) y consumos de alimentos, proteína y energía de los grupos T y K al término de la fase I	48
16.	Velocidad de crecimiento y peso corporal al inicio y al final de todos los tratamientos correspondientes a las fases I y II	53
17.	Eficiencia de conversión alimenticia (ECA) y consumos de alimento para todos los tratamientos correspondientes a las fases I y II	55
18.	Consumo de inulina por los distintos tratamientos durante la	

	fase II	56
19.	Cuenta microbiana en heces de los grupos T y K al final de la fase I	57
20.	Cuenta microbiana en heces de todos los grupos evaluados al final de la fase II	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1.	Muertes en niños menores de 5 años asociadas con desnutrición	4
2.	Representación de los roles benéficos de los prebióticos sobre el tracto gastrointestinal de mamíferos y sus efectos sistémicos	19
3.	Estructura química de la inulina	21
4.	Diagrama general del desarrollo experimental	30
5.	Curva de crecimiento de los grupos testigo y desnutrido durante la fase I	46
6.	Comparación del aspecto de una rata testigo y una desnutrida al término de la fase I	46
7.	Curva de crecimiento de los grupos testigo. Fase I y II	49
8.	Curva de crecimiento de los grupos desnutridos. Fase I y II	50
9.	Curva de crecimiento de todos los grupos. Fase I y II	51
10.	Réplica de crecimiento en placa de enterobacterias.	71
11.	Crecimiento en placa de anaerobios totales.	71
12.	Crecimiento en placa de lactobacilos de los grupos testigo al final de la fase II	72
13.	Crecimiento en placa de lactobacilos de grupos desnutridos y recuperados al final de la fase II	72
14.	Prueba positiva de presencia de bifidobacterias y prueba negativa	73
15.	Crecimiento de bifidobacterias. Muestra KA, fase II	74
16.	Crecimiento de bifidobacterias. Muestra KC, fase II	75

ABREVIATURAS

DEP	<i>Desnutrición energética-proteínica</i>
DE	<i>Desviación estándar</i>
DP	<i>Grado de polimerización</i>
ESM	<i>Error estándar de la media</i>
FISH	<i>Hibridación fluorescente in situ</i>
FOS	<i>Fructo-oligosacáridos</i>
GALT	<i>Tejido linfático asociado al tracto gastrointestinal</i>
GFR	<i>Velocidad de filtración glomerular</i>
GLP	<i>Péptido semejante a glucagón</i>
GOS	<i>Galacto-oligosacáridos</i>
IgA	<i>Inmunoglobulina A</i>
NMP	<i>Número más probable</i>
PC	<i>Peso corporal</i>
RNA_r	<i>Ácido ribonucleico ribosomal</i>
SCFA	<i>Ácidos grasos de cadena corta</i>
UFC	<i>Unidades formadoras de colonia</i>

RESUMEN.

Con frecuencia se asocia la desnutrición energética proteínica (DEP) con enfermedades infecciosas, que por sí mismas desencadenan la disminución en la absorción de nutrimentos. El uso de prebióticos, como la inulina, ha ido en aumento para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, debido a que favorecen el crecimiento y actividad de bacterias colónicas benéficas para el organismo. Entre estos beneficios se encuentra la protección contra el crecimiento de microorganismos patógenos, e incluso en mejorar la respuesta inmune. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la adición de inulina en dietas de recuperación sobre la microbiota en heces de ratas jóvenes desnutridas. El estudio se llevó a cabo en dos grupos de animales: desnutrido (K) y testigo (T). El cuadro de desnutrición grave se desarrolló alimentando a los animales con proteínas de baja eficiencia de conversión en la dieta por un lapso de un mes. Posteriormente, los animales se sometieron a recuperación, administrando en la dieta dos concentraciones de inulina comercial de achicoria: 2 y 4% por un período de dos meses. A la par se trabajó con un grupo testigo para cada concentración de inulina. Al final de cada fase se cuantificaron los siguientes grupos de microorganismos: bifidobacterias, lactobacilos, enterobacterias y anaerobios totales en heces. A partir de los resultados de proteína y energía ingeridas, así como el nivel de proteínas plasmáticas de los animales desnutridos, se confirmó que el estado fisiológico correspondía a un grado de desnutrición kwashiorkor. El análisis microbiológico de las heces de ratas desnutridas indicó una disminución significativa en el número de bifidobacterias y anaerobios totales con respecto al grupo testigo. Después de la fase de recuperación se observó que en los grupos testigo y desnutrido alimentados con 2% de inulina (TC y KC, respectivamente), la carga microbiana no presentó diferencia significativa con respecto a los grupos que no recibieron inulina (TA y KA). Tanto el grupo testigo (TE) como el grupo desnutrido y recuperado (KE) que fueron alimentados con 4% de inulina, presentaron aumento significativo en la carga de bifidobacterias y lactobacilos y disminución en la frecuencia de la proliferación de enterobacterias. Finalmente, la carga de anaerobios totales permaneció sin cambio con respecto a los grupos sin inulina. Los datos obtenidos a lo largo del estudio confirman que la inulina es un prebiótico adecuado para la recuperación de microbiota benéfica como bifidobacterias y lactobacilos en animales previamente desnutridos y posiblemente, actúe como coadyuvante en el tratamiento de casos de desnutrición.

INTRODUCCIÓN.

La desnutrición constituye un problema serio de salud pública en México y debido a su estrecha relación con enfermedades diarreicas agudas continúa siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en niños menores a cinco años. Es una condición patológica que se origina como resultado de varios factores que interactúan entre sí, ya que es provocada no sólo por una escasez en la disponibilidad de alimentos, sino incluso por defectos en los patrones de alimentación (deficiencia en el consumo de proteínas de buena calidad, micronutrientes y bajo nivel energético) y/o insalubridad que conlleva a enfermedades gastrointestinales y en general, malas condiciones de vida.

Cuando un individuo padece desnutrición se presenta una desaceleración del crecimiento y desarrollo, reducción en los mecanismos de defensa contra infecciones y alteraciones en el aparato digestivo, atrofiándose la mucosa intestinal, e incluso se puede producir la atrofia de páncreas e hígado.

El uso de prebióticos, como la inulina, ha ido en aumento para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, debido a que favorecen el crecimiento y actividad de bacterias colónicas benéficas para el organismo. Entre estos beneficios se encuentra la protección contra el crecimiento de microorganismos patógenos, e incluso el mejorar la respuesta inmune.

Uno de los prebióticos más utilizados es la inulina, la cual es una mezcla de polímeros lineales de fructosas unidas por enlaces $\beta(2-1)$, al final de la cadena de fructosas tienen una glucosa con un enlace $\alpha(1-2)$. Debido a las uniones β , la inulina no es digerida ni absorbida en el intestino delgado pero en el colon es fermentada por la microbiota presente. Se ha demostrado que la inulina funciona como un prebiótico que otorga beneficios a los sistemas gastrointestinal e inmune y que además aumenta la absorción de calcio y magnesio. También está relacionada con la reducción en los niveles de colesterol y lípidos en sangre.

Con base en los trabajos existentes sobre los estudios clínicos de los atributos de la inulina, en el presente estudio se pretende averiguar si la adición de inulina en la dieta tiene un efecto benéfico en la recuperación de los daños causados en ratas desnutridas.

Para ello, se propone desarrollar un cuadro de desnutrición kwashiorkor, ya que ésta es una de las desnutriciones graves que se presenta en lactantes y en niños escolares. Se espera que los animales desnutridos puestos en recuperación con las dietas adicionadas con inulina, restablezcan y/o aumenten la flora microbiana benéfica. Esta información será la base para

estudios posteriores sobre el posible efecto en el restablecimiento de la respuesta inmunológica en niños desnutridos.

1. GENERALIDADES.

1.1. Desnutrición Energética-Proteínica (DEP)

La desnutrición es un problema de salud de gran impacto en el mundo, siendo un factor asociado en cerca del 50% de los 10-11 millones de muertes que se presentan al año en niños menores de 5 años, por causas tratables como las señaladas en la Figura 1 (Collins, *et al.*, 2006). La prevalencia de la desnutrición es mayor en países subdesarrollados y en vías de desarrollo, como México. De acuerdo al Reloj Nacional de Desnutrición, en nuestro país hay 919,000 niños menores de 5 años que padecen desnutrición activa en alguno de sus grados, lo que afecta su crecimiento y maduración (Chávez y Ávila, 2009).

Es conveniente destacar que la desnutrición presenta características específicas en cada etapa del ciclo de vida y que el tipo de deficiencia compromete de manera particular la función del organismo a diferentes edades. De esta manera, es necesario reconocer por separado la desnutrición *in utero*, de la infantil (o preescolar), de la escolar, de la del adolescente, de la del adulto o el anciano, así como de la materna. Por ejemplo una deficiencia marginal de ácido fólico en un adolescente puede manifestarse como una anemia trivial, mientras que en una mujer embarazada puede ser un factor de alto riesgo para malformaciones congénitas graves en el feto (Ávila y Shamah, 2005).



Figura 1. Muertes en niños menores de 5 años asociadas con desnutrición a nivel mundial. (Fuente: UNICEF, 2007)

La *desnutrición energética proteínica (DEP)* es una condición patológica ocasionada por la carencia de múltiples nutrimentos, derivada de un *desequilibrio* provocado por un aporte insuficiente al *gasto energético*. La insuficiencia en el aporte es principalmente en la fuente de proteína, ya sea porque ésta es de baja conversión y/o insuficiente para los requerimientos, o bien, por alteraciones en la *digestión* o en la *absorción* de los nutrimentos. El *gasto excesivo* puede producirse por condiciones estresantes que aumentan los requerimientos de energía. La forma más frecuente de la DEP combina un mayor *gasto de nutrimentos* con un aporte que no satisface las demandas, lo que conduce al *agotamiento* de las reservas tisulares, cuya expresión clínica es la *merma de crecimiento* en diferentes grados, acompañada de una amplia gama de *trastornos funcionales* (Touissant y García-Aranda, 2001).

1.1.1. Clasificación de la DEP.

Algunos autores suelen clasificar a la *desnutrición* de acuerdo a la etapa en la que se presenta. En la medida que la *desnutrición* suele dejar *secuelas permanentes*, es posible reconocer que un individuo padeció *desnutrición* en una etapa previa de su vida (*desnutrición anterior*) o si un individuo se encuentra totalmente *desnutrido* (*desnutrición actual*) (Ávila y Shamah, 2005). En 2001, Touissant y García-Aranda señalaron que la clasificación de la DEP puede basarse en función de:

1. Las causas que la producen, es decir, por su etiología se divide en:
 - a) *primaria* cuando se debe a *deficiencia* en la *ingesta de alimentos* (y por ende de nutrimentos) originada por *condiciones socioeconómicas* que limitan la *capacidad de compra, preparación o consumo de alimentos*;
 - b) *secundaria* cuando el alimento que se consume no se aprovecha en forma adecuada a causa de *situaciones fisiopatológicas* existentes (*infecciones, cáncer, SIDA, anorexia nerviosa, entre otras*) y
 - c) *mixta*, la cual es el resultado de una combinación de las dos anteriores.

2. El tiempo de evolución a partir de los indicadores establecidos por Waterlow. Dicha clasificación permite determinar la *cronología de la DEP* y se basa en:

- a) la emaciación muscular que indica peso inferior al que corresponde por estatura de una población de referencia de la misma talla y sexo y
 - b) el desmedro o retraso en el crecimiento determinado por el indicador de estatura para la edad.
3. La magnitud o gravedad, que se clasifica con el indicador antropométrico de peso para la edad establecido por Gómez en 1946, el cual considera el peso para la edad con respecto a una población de referencia para la misma edad y sexo, expresándolo en porcentaje del peso/edad, manejando los siguientes términos:
- a) leve (90-76%) si la deficiencia es incipiente y sin riesgo de secuelas importantes
 - b) moderada (75-60%) si el daño no es suficiente para comprometer la vida en forma inminente pero el riesgo de secuelas es elevado y
 - c) grave (<60%) si la deficiencia pone en peligro la vida del individuo.

La Organización Mundial de la Salud ha establecido los puntos de corte de los índices antropométricos para la clasificación de la desnutrición grave. En su última actualización, sugiere la medición de la circunferencia del brazo superior como criterio adicional para la clasificación (WHO/UNICEF, 2009).

México ha adoptado desde 1993 los índices antropométricos de peso para la edad, estatura para la edad y peso para la estatura con las tablas de referencia recomendadas por la Organización Mundial de la Salud. Una vez que se asocian dichos índices a intervalos unitarios de desviación estándar (DE) por debajo de la mediana de la población de referencia se establece el grado de desnutrición y las acciones sugeridas para su tratamiento (NOM-031-SSA2-1999). En la Tabla 1 se presentan los valores de referencia para cada indicador y la clasificación del estado nutricional del niño menor a 5 años. La Norma Oficial Mexicana recomienda que se consideren dos de los tres indicadores para definir el estado nutricional.

Tabla 1. Valores de referencia para indicadores del estado nutricional del niño menor a 5 años.¹

Desviaciones estándar (DE) con relación a la mediana	Peso para la edad	Estatura para la edad	Peso para la estatura
+ 2 a + 3	Obesidad	Alta	Obesidad
+ 1 a + 1.99	Sobrepeso	Ligeramente alta	Sobrepeso
más-menos 1	Peso normal	Estatura normal	Peso normal
- 1 a - 1.99	Desnutrición leve	Ligeramente baja	Desnutrición leve
- 2 a - 2.99	Desnutrición moderada	Baja	Desnutrición moderada
- 3 y menos	Desnutrición grave	Baja	Desnutrición grave

¹ Fuente: NOM-031-SSA2-1999.

1.1.1.1 Clasificación de la DEP grave.

Dentro de la DEP clasificada como grave se presentan dos manifestaciones clínicas conocidas como marasmo (sin presencia de edema) y kwashiorkor (caracterizada por la presencia de edema), aunque en algunos casos se presenta la combinación de ambos: kwashiorkor-marasmico (edema y desmedro). En la Tabla 2 se muestran algunas características representativas de ambos tipos de DEP grave.

Se han propuesto varios factores que podrían estar asociados con la aparición de marasmo o kwashiorkor. Las situaciones que predisponen al marasmo son una ingesta dietética deficiente en todos los nutrimentos durante un período de tiempo prolongado aunada a infecciones, lo que produce carencia de proteína y energía, las cuales conservan su relación; en este caso hay una adaptación usual a inanición. Su característica clave es la emaciación extrema, desgaste notable de músculo y tejido subcutáneo, desarrollo deficiente muy manifiesto que al prolongarse detiene el crecimiento lineal y presenta entonces desmedro. Además se presenta hipotermia, retardo motor y debilidad y atrofia muscular que causa profusión abdominal (Lagrutta, F., 1995).

Aunque el marasmo se presenta principalmente en países en vías de desarrollo, en países industrializados se dan tres factores que pueden provocarlo: desórdenes del apetito y del comportamiento como anorexia nerviosa y bulimia, alteración de la absorción de nutrimentos y una velocidad metabólica incrementada por el desgaste muscular (Bender, 2002).

Tabla 2. Características representativas de los tipos de DEP grave.¹

Característica	Marasmo	Kwashiorkor
Inicio	Vida intrauterina a primer año de edad	Después del segundo año de edad
Evolución	Crónica	Aguda
Indicador peso/edad	Inadecuado	Adecuado
Indicador peso/talla	Adecuado	Inadecuado
Frecuencia y tipo de enfermedades	Frecuentes, principalmente gastrointestinales y respiratorias	Menos frecuentes, aparece después de un cuadro agudo de enfermedad
Apariencia	Emaciado, cara de angustia	Farináceo, edematoso
Conducta	Irritable, llora mucho	Apático, triste
Tejido muscular	Muy disminuido	Muy disminuido
Tejido graso	Muy disminuido	Presente, escaso
Hígado	Tamaño normal	Aumentado (esteatosis)
Edema	Ausente	Presente
Piel	Seca, plegadiza, sin dermatosis	Lesiones húmedas, con dermatosis
Complicaciones	Casi siempre presenta infecciones y alteraciones electrolíticas y ácido básicas	
Hemoglobina	Baja	Muy baja (anemia)
Proteínas plasmáticas	Casi normales	Bajas
Relación AAI/AAD ²	Mayor que en kwashiorkor	Baja
Hormona de crecimiento	Normal a baja	Alta
Recuperación	Prolongada (meses)	Breve (semanas)

¹ Fuente: Touissant y García-Aranda, 2001. ² Relación aminoácidos indispensables/aminoácidos dispensables.

El kwashiorkor está asociado con una deficiencia proteínica en la dieta en relación con el contenido de energía, el cual puede ser adecuado o excesivo. La deficiencia de la proteína puede deberse tanto a la ingestión de cantidades insuficientes de ella, como a la ingesta de proteínas de baja eficiencia de conversión, además, de la ingesta excesiva de cereales y tubérculos (Touissant y García-Aranda, 2001). Es decir, la manifestación de kwashiorkor se produce por la falta de adaptación ordinaria a la deficiencia de proteína en la cual se protege el hígado a expensas del músculo. Cuando hay falta severa de alimentos, los ajustes endocrinos movilizan los ácidos grasos del tejido adiposo y a los aminoácidos del tejido muscular. Sin embargo, una ingesta rica en hidratos de carbono y baja en proteínas puede modificar dichos ajustes. La

degradación de proteínas tisulares se reduce y los aminoácidos libres disminuyen por lo que a su vez disminuye la síntesis de proteínas viscerales. Al disminuir la síntesis de proteínas plasmáticas en el hígado, especialmente de albúmina, se reduce la presión intravascular. El agua plasmática disminuye y se acumula en los tejidos extravasculares, la presión tisular aumenta y la función cardiaca disminuye, lo cual contribuye a la aparición del edema característico (Torún y Chew, 1994).

1.1.1.2. Modificaciones fisiopatológicas de la DEP.

En la dinámica de la desnutrición se genera un estado de adaptación metabólica debido a la escasez de nutrimentos y frecuentes cuadros de infección, con el fin de la preservación de la vida (Ávila y Shamah, 2005). La disminución en el consumo de energía es seguida de una disminución en la actividad física. Si la reducción en el gasto energético no es suficiente, entonces se aprovecha la grasa corporal, reflejándose en el peso. La baja disponibilidad de la dieta reduce la síntesis de proteínas del organismo, a largo plazo la pérdida proviene del músculo esquelético.

Debido a la necesidad de mantener la homeostasis de energía, aumentan las concentraciones de cortisol (principalmente en kwashiorkor) y de hormona adrenocorticotrófica, promoviendo la gluconeogénesis y la movilización de ácidos grasos. Se puede producir una atrofia del páncreas generando una reducción en la secreción de enzimas como lipasas, tripsina y amilasas (Penny, 2003).

Un efecto grave de la DEP es el deterioro en la regeneración de la mucosa intestinal. Las células de la mucosa intestinal se recambian rápidamente, el proceso de replicación celular va desde las criptas hasta la reposición de células en el lumen intestinal. Cuando se presenta DEP con frecuencia se produce un acortamiento y a veces un aplanamiento de las vellosidades del borde en cepillo de la mucosa intestinal. En situaciones graves la mucosa intestinal es casi lisa, lo que origina una reducción considerable del área superficial de la mucosa y por tanto el área sobre la cual los nutrimentos pueden absorberse, si es que se encuentran disponibles en la dieta (Torún y Chew, 1994).

Además, al ser ésta la zona en la cual se encuentra la mayor parte de las enzimas digestivas, entre ellas las peptidasas y disacaridasas, se presenta una disminución de las enzimas del borde del cepillo lo que reduce la absorción de nutrimentos. La absorción de las proteínas se ve

reducida entre un 10 y un 30% de lo normal. Con respecto al metabolismo de hidratos de carbono, la presencia de la DEP produce una reducción en la capacidad de digestión sobre todo de la lactosa, siendo fermentada por la flora microbiana generando ácido láctico que produce dolor abdominal y diarrea. Por lo anterior, se sugiere evaluar si hay intolerancia a lactosa con el fin de saber qué tipo de leche debe o no incluirse en la dieta (Touissant y García-Aranda, 2001).

1.1.2. Ciclo desnutrición-infección.

Con frecuencia se presenta el ciclo desnutrición-infección-desnutrición por presencia e interacción de varios factores entre los que destacan: la ablactación prematura o tardía, uso inadecuado de sucedáneos de la leche humana y falta de higiene en su preparación que provoca enfermedades gastrointestinales, que por sí mismas desencadenan la disminución de la absorción de nutrimentos, aumento de las pérdidas urinarias de nitrógeno y electrolitos y aumento en el gasto energético basal. Esto último tiene como consecuencia que las reservas corporales de grasa, carbohidratos (glucógeno) y proteína se usen para satisfacer las necesidades energéticas, produciéndose así una disminución del crecimiento. El desequilibrio nutricional es una causa significativa y frecuente de inmunodeficiencia, ya que al presentarse una reducción general de síntesis proteínica se disminuye la respuesta inmune (Touissant y García-Aranda, 2001). Aunado a esto, la actividad inmunológica del intestino (que contiene el 50% del retículo endotelial y produce la mayor cantidad de Inmunoglobulinas A) se ve disminuida considerablemente a consecuencia del periodo de desnutrición (Dock, *et al.*, 2004).

El mal manejo de las infecciones, vómito y anorexia (síntoma clásico de la infección en niños), conducen a un estado de desnutrición que, a su vez, favorece la presencia de episodios infecciosos más frecuentes y de mayor duración en medios ambientes insalubres (Chandra, 1983).

En nuestro país, la mortalidad por enfermedades infecciosas gastrointestinales ocupa el 15° lugar, entre las cuales destacan: salmonelosis, tifoidea, cólera y gastroenteritis. Los estados más afectados con dichas enfermedades son Oaxaca, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Coahuila y Chihuahua. Con relación a los indicadores del estado nutricional, los estados del sur son los que presentan mayor prevalencia de bajo peso para la edad (DGS-SSA, 1998; Cuevas, *et al.*, 2007), lo cual puede establecer la relación intrínseca entre cuadros de desnutrición en alguno de sus grados con cuadros infecciosos.

1.1.3. Protocolos para el manejo de desnutrición.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido un protocolo para el manejo de la desnutrición, el cual comprende diez puntos divididos en dos fases: estabilización y rehabilitación del paciente (Ver Tabla 3). La visión aceptada es que la implementación de los lineamientos de la OMS en relación al entrenamiento e incorporación de personal médico es la clave para disminuir la mortalidad a nivel mundial. La evidencia de los efectos positivos de estos protocolos proviene de estudios realizados en hospitales seleccionados con recursos económicos óptimos y personal calificado, lo cual sugiere que la disponibilidad de suficientes recursos es vital para lograr el éxito y efectividad del protocolo.

Tabla 3. Principios generales del tratamiento sistemático propuesto por la OMS.¹

Paso 1.	Tratar/prevenir la hipoglucemia.
Paso 2.	Tratar/prevenir la hipotermia.
Paso 3.	Tratar/prevenir la deshidratación.
Paso 4.	Corregir los desequilibrios electrolíticos.
Paso 5.	Tratar/prevenir las infecciones.
Paso 6.	Corregir las carencias de micronutrientes.
Paso 7.	Empezar a alimentar prudentemente.
Paso 8.	Lograr la recuperación del crecimiento.
Paso 9.	Proporcionar estimulación sensorial y apoyo emocional.
Paso 10.	Preparar el seguimiento tras la recuperación.

¹Fuente: Ashworth, A. (2004).

En el caso de hospitales en países en vías de desarrollo, el índice de mortalidad por desnutrición sigue siendo elevado. La persistencia de estos altos índices se atribuye al manejo inapropiado de los casos debido a desconocimiento y a la falta de personal capacitado que proporcione el cuidado a los pacientes. En 2008, Berti y colaboradores publicaron sus resultados de implementar los lineamientos de la OMS para el tratamiento de niños con desnutrición grave en un hospital rural de Etiopía. Los autores demostraron que la correcta aplicación del programa en tratamiento hospitalario logra disminuir el índice de mortalidad; reconociendo la importancia de la capacitación del personal, la identificación y tratamiento de enfermedades relacionadas.

Debido a la preocupación de la limitada capacidad de las unidades hospitalarias, se promovió el traslado del tratamiento de los hospitales a las comunidades, a través de centros de rehabilitación nutricional, clínicas y hogares. Ashworth, revisó 27 de estos programas durante los años 80's y 90's y encontró que sólo seis de ellos habían logrado disminuir los cuadros de desnutrición en su comunidad. Concluyó que el tratamiento en centros comunitarios y en el hogar, rara vez surte efecto positivo y que finalmente los pacientes son hospitalizados.

Para el 2005, Ashworth actualizó su revisión incluyendo seis estudios donde se habían utilizado alimentos terapéuticos listos para su consumo. En cinco de estos estudios, se encontraron resultados favorecedores para la recuperación promoviendo los programas de atención comunitarios. La revisión realizada por Ashworth indica que el desarrollo reciente de estos alimentos terapéuticos listos para su consumo, facilita la entrega de alimentos seguros para el tratamiento de pacientes externos (Collins, *et al.*, 2006).

Dichos alimentos terapéuticos listos para su consumo son fórmulas de alta densidad energética enriquecidos con minerales y vitaminas, que al no requerir tratamiento térmico para su consumo no disminuye su calidad nutricional (World Health Organization, *et al.*, 2007). Al tratarse de fórmulas de consistencia untuosa y de baja actividad acuosa facilitan su manejo y disminuyen la posibilidad de crecimiento de microorganismos. El desarrollo de estos productos y su manejo en centros comunitarios han permitido que se disminuyan los tiempos de hospitalización de un promedio de 30 días a sólo 5-10 días.

Esta propuesta basada en el cuidado comunitario sugiere un nuevo sistema de clasificación de la desnutrición aguda, no sólo moderada y grave como lo establece la OMS, sino incluir la desnutrición con complicaciones, con el fin de facilitar el manejo operacional de los centros comunitarios. Dentro de este rubro se consideraría además de la presencia de edema y el bajo peso para la estatura, la presencia de una o más de las siguientes complicaciones: anorexia, infección en vías respiratorias, fiebre, deshidratación severa, anemia y estado de no alerta del individuo. Si el individuo presenta dicho cuadro, requeriría de tratamiento hospitalario para su estabilización, mientras que un cuadro de desnutrición grave sería remitido a tratamiento ambulatorio, con el fin de disminuir las probabilidades a contraer infecciones hospitalarias. Finalmente, si se presenta un cuadro de desnutrición moderado el manejo consistiría de apoyo con alimentos terapéuticos enriquecidos listos para su consumo (Collins, *et al.*, 2003).

En México, una vez clasificado al niño según la comparación de sus índices antropométricos con los valores mencionados en la Tabla 1 establecidos por la NOM-031-SSA2-1999, se sugieren las siguientes directrices para el tratamiento de la desnutrición:

- ✓ Si el crecimiento y el estado nutricional del niño se encuentra con desnutrición leve o moderada, talla ligeramente baja (entre 1 y 2 DE), citar cada 30 días para orientación sobre la alimentación, higiene, inmunizaciones e hidratación oral.
- ✓ En caso de encontrar alteraciones en el crecimiento y en el estado de nutrición, se investigan las causas probables (enfermedades o mala técnica de alimentación, entre otras) y se indica el tratamiento y medidas complementarias. En caso de no corregirse las alteraciones con el tratamiento indicado, se envía a un servicio de atención médica especializada y, una vez resuelto el problema, se continúa el control en el primer nivel de atención.
- ✓ Si el niño se encuentra con desnutrición grave u obesidad, y/o talla baja (más de 3 DE), se deriva al niño a un servicio de atención médica especializada y, una vez restablecido el estado nutricional, se continúa el control en el primer nivel de atención.

Generalmente el tratamiento inicia con una alimentación frecuente y escasa a base de alimentos líquidos y con bajo contenido de lactosa. Una vez que el paciente comienza a restaurar la mucosa intestinal (cuando cesa la diarrea), entra a la fase de rehabilitación y se introducen gradualmente alimentos lácteos, para recuperar la mayor parte del peso perdido. En esta fase se potencia la estimulación emocional y física, se enseña a la madre a continuar los cuidados en casa y se hacen los preparativos para dar de alta al paciente. Para el seguimiento del paciente en casa se establece un control del niño y de su familia para prevenir las recaídas y garantizar el desarrollo físico, mental y emocional progresivo del paciente.

1.2. Flora microbiana intestinal.

Debido a su complejidad, la flora microbiana humana continúa siendo un área de investigación que está estrechamente relacionada a la variabilidad entre individuos por aspectos genéticos e incluso, por cambios en los hábitos alimentarios o administración de antibióticos orales. Aunado a lo anterior, la dilucidación de la microbiota es dependiente de los métodos utilizados

tanto para la obtención de muestras como para su cuantificación e identificación, así como de la zona del tracto gastrointestinal que se está estudiando o bien, si la muestra proviene de heces.

La microflora colónica se adquiere en el nacimiento y durante los primeros meses de edad. En niños alimentados con fórmula se observa una mayor variedad en la microflora, incluso está en función de la composición de la leche, por ejemplo: la presencia de hierro favorece el crecimiento de *Enterobacteriaceae* y algunas especies del género *Clostridium* y *Bacteroides*, mientras que la baja concentración de hierro favorece predominantemente especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. A través de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) se determinó que el género *Bifidobacterium* se encuentra en mayor cantidad en heces de lactantes que en heces de adultos y constituyen el 71% de la microflora fecal en niños alimentados con fórmula y 91% en niños amamantados (Tannock, 2000). La ablactación da como resultado cambios significativos en la composición, pues se incrementa el número de *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Clostridium* y *Bacteroides* (Granato, 2006).

Con relación a la flora microbiana de adultos se han cuantificado cientos de especies bacterianas a través de medios selectivos y métodos tradicionales; de las cuales cerca de 30-40 especies pertenecían a 6 géneros que representan el 99% de la microflora. Gran parte de las bacterias que se encuentran en el colon son anaerobios no esporulados e incluyen a miembros de los géneros: *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Eubacterium*, entre otros. El género *Clostridia* también se encuentra, aunque es superado en número por los anaerobios no esporulados, así como por anaerobios facultativos como *Streptococcus*, y *Enterobacteriaceae* (Cummings, 1997).

El marco filogenético provisto por la comparación de secuencias de genes de ácido ribonucleico ribosomal (RNAr) 16S permite realizar la identificación de especies y por lo tanto dilucidar la comunidad bacteriana. Un estudio de este tipo arrojó que tres divisiones bacterianas representaban el 95% de la microbiota fecal humana: *Bacteroides*, *Clostridium coccoides* y *Clostridium leptum*. Mientras que un estudio realizado en Francia empleando métodos de hibridación DNA-RNA mostró que el 37% de la microflora fecal correspondía a *Bacteroides*, *Prevotella* y *Porphyromonas*, 16% al grupo de *Clostridium coccoides* y 14% al grupo de *Clostridium leptum*. *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Enterobacteriaceae* se encuentran cada una en proporciones del 1% de la microflora (Tannock, 2002).

Dentro de la amplia gama de microorganismos que constituyen la microflora, es posible identificar ciertos marcadores que se asocian con un tracto intestinal saludable y que se han venido utilizando como probióticos: microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas confieren efectos benéficos al hospedero (FAO, 2007). Éstos incluyen especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, las cuales pueden inhibir la colonización por patógenos y se considera que ejercen un efecto protector contra desórdenes agudos y crónicos (Olano-Martin, *et al.*, 2000).

1.2.1. Efecto benéfico de la flora microbiana intestinal.

La flora microbiana normal influye en una variedad de funciones intestinales, por ejemplo: algunos micronutrientes como folatos y vitamina K son producidos por bacterias entéricas. Los azúcares dietéticos no absorbibles son degradados por las bacterias y convertidos en ácidos grasos de cadena corta, los cuales son usados por la mucosa colónica como fuente de energía. Incluso, el metabolismo bacteriano está involucrado en la liberación de fármacos en el lumen intestinal a partir de profármacos, como es el caso de la sulfasalazina.

La flora microbiana es uno de los principales constituyentes de la barrera de defensa contra microorganismos patógenos y toxinas y se considera la primera línea de defensa del tracto intestinal. El epitelio intestinal es expuesto diariamente a antígenos bacterianos de la microflora benéfica, que induce un estado de inflamación controlada. La respuesta fisiológica a antígenos bacteriales no es dañina para el organismo y genera la inducción de tolerancia inmune y la secreción de IgA. Se sabe que las bacterias probióticas pueden inhibir la adhesión de patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium a las células epiteliales. El mecanismo no está completamente dilucidado aunque las propuestas más aceptadas incluyen la competencia a sitios de unión, o bien, a la estimulación de producción de mucina por parte del hospedero (Rastall *et al.*, 2005). De hecho, una falla en este mecanismo de defensa, resulta en un incremento de transporte de antígenos y toxinas a través de la mucosa (Quiley y Quera, 2006).

La adición de probióticos en productos lácteos confiere efectos inmunomoduladores en el individuo, reduciendo la tendencia a alergias y dermatitis atópicas. Sin embargo, el beneficio generado por los probióticos es dependiente de la cepa que se está administrando, así como de su proliferación exitosa en el colon humano que es afectada por las condiciones ácidas del

estómago, los daños en la membrana por efecto de las sales biliares y la competencia de sustrato y nicho con otros microorganismos (Van de Wiele, *et al.*, 2004).

1.3. Prebióticos.

Actualmente, no hay lineamientos gubernamentales aceptados por la industria del uso del término prebiótico en alimentos. Originalmente, en 1995, un prebiótico se definía “como un ingrediente alimenticio no digerible, que afecta benéficamente al hospedero a través de la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon, y que mejora la salud del hospedero” (Gibson, *et al.*, 2004). Una definición más reciente establece que un prebiótico “es un ingrediente fermentativo selecto que permite cambios específicos, tanto en la composición y/o actividad en la microbiota gastrointestinal que confieren beneficios sobre la salud y bienestar del hospedero” (FAO, 2007).

El principal concepto asociado con ambas definiciones es que un prebiótico tiene un efecto selectivo sobre la microbiota que resulta en un mejoramiento del hospedero. Las definiciones surgen de observaciones sobre fibras dietéticas particulares que brindan una modulación específica de la microbiota del tracto gastrointestinal, particularmente un incremento del número de bifidobacterias y/o lactobacilos, y que la ingesta de dichos compuestos están asociados con la mejora en la salud del hospedero (Reid, 2008).

Sin embargo, en la actualidad se ha manejado que muchos de los oligosacáridos y polisacáridos tienen una actividad prebiótica, pero no todos los hidratos de carbono dietéticos son prebióticos. Dicha clasificación requiere demostrar que el ingrediente cumple con los siguientes criterios:

1. resiste la acidez gástrica, la hidrólisis enzimática y la absorción gastrointestinal,
2. es fermentado por la flora microbiana intestinal y
3. estimula selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales asociadas con la salud y el bienestar.

De estos tres puntos, el más complicado de demostrar es el último, pues se dificulta al considerar las interacciones bacterianas que ocurren. Típicamente se seleccionan cepas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* para su estimulación selectiva por efecto de los prebióticos. El inconveniente de dicha selección de cepas es que no pueden considerarse como representativos

de la microbiota colónica. Un método *in vitro* con mejores aproximaciones es el que emplea inóculos de heces, pues asegura un rango representativo de las especies bacterianas al que estará expuesto el prebiótico (Gibson, *et al.*, 2004).

Con el fin de comparar el efecto benéfico entre distintos prebióticos y de esta manera expandir su manejo en la industria alimentaria, se planteó el uso del Índice prebiótico (PI). El cual relaciona el incremento de grupos bacterianos considerados benéficos (principalmente *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) y el decremento de grupos indeseables (*Clostridia* y *Bacteroides*) tras el consumo del prebiótico evaluado. Sin embargo, dicho aproximación se enfrenta a la variabilidad de la microflora entre individuos y a la complejidad del efecto prebiótico por lo que no es considerado por todos los estudios (Rastall, *et al.*, 2005).

En la Tabla 4 se enlistan algunos de los prebióticos de los que se cuentan con suficientes datos para permitir clasificarlos como tales. La mayoría de los estudios están enfocados a los fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS) e inulina. Estos tres hidratos de carbono cuentan con una larga historia de uso seguro y se consideran como relativamente inocuos, aunque hay cierta preocupación del incremento de producción de gases al ingerirse altas concentraciones. Una serie de nuevos compuestos prebióticos como gluco-oligosacáridos, levanos, almidón resistente, gentio-oligosacáridos, xilosacáridos y los oligosacáridos de la soya, están siendo evaluados con estudios *in vitro* e *in vivo* con animales de laboratorio, pero escasamente ensayos con humanos (FAO, 2007).

Tabla 4. Oligosacáridos prebióticos.¹

Prebiótico	Criterios cubiertos para considerarse prebiótico (Gibson, <i>et al.</i> , 2004)
FOS	La evidencia demuestra que cumple con todos los criterios
GOS	Aunque no está completamente cubierto el primer criterio, se clasifica como prebiótico por la cantidad de estudios clínicos
Inulina	La evidencia demuestra que cumple con todos los criterios
Isomalto-oligosacáridos	Los estudios <i>in vitro</i> no demuestran crecimiento selectivo, aunque ensayos en humanos arrojan resultados positivos
Lactulosa	Aunque no está completamente cubierto el primer criterio, se clasifica como prebiótico por los numerosos estudios clínicos en los que se demostró la estimulación en el crecimiento de bifidobacterias

¹Fuente: Quigley y Quera (2006)

El mercado de prebióticos en alimentos ha crecido rápidamente. Un reporte del mercado mundial de prebióticos señala que hay cerca de 400 productos alimenticios con prebióticos y más de 20 compañías produciendo oligosacáridos y fibras usadas como prebióticos. El mercado europeo de prebióticos es cerca de 87 millones de euros, y se estima que alcanzará los 179 millones de euros para el 2010. Este es un dramático repunte, en parte explicado por el aumento en la diversidad de productos donde se pueden adicionar prebióticos. (FAO, 2007).

1.3.1. Mecanismos de prebiosis.

Los efectos de prebióticos se han dirigido principalmente hacia el colon, pero existe evidencia que demuestra que los prebióticos ejercen su efecto benéfico a lo largo del tracto gastrointestinal. Al estimular selectivamente el crecimiento de flora benéfica, mejoran el sistema inmune, protegen contra patógenos y facilitan el metabolismo de lípidos del hospedero así como la absorción de minerales. Los diferentes mecanismos de la acción prebiótica se encuentran resumidos en la Figura 2.

La fermentación está caracterizada por metabolismo de hidratos de carbono en el colon proximal, con incremento de proteólisis en la parte distal. Dentro de los productos finales de la fermentación que proporcionan efectos benéficos se encuentran los ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés), particularmente el butirato que actúa como fuente de energía de células epiteliales colónicas. El butirato es usado principalmente por los colonocitos como una fuente de energía y estimula el desarrollo y crecimiento del intestino delgado y grueso a través de la estimulación de la proliferación de células epiteliales (Kuzmuk, *et al.*, 2005).

En el caso de los lactobacilos y bifidobacterias, sus productos de fermentación como ácido láctico y ácido acético pueden ser subsecuentemente degradados por otras bacterias. Esta relación entre microorganismos explica el incremento de ácidos grasos de cadena corta observado en la presencia de prebióticos (Saulnier, *et al.*, 2009). Además, las bifidobacterias cuentan con actividad β -fructofuranosidasa por lo que son el grupo bacteriano que mejor aprovechan a prebióticos del tipo de los fructanos (Rastall, *et al.*, 2005).

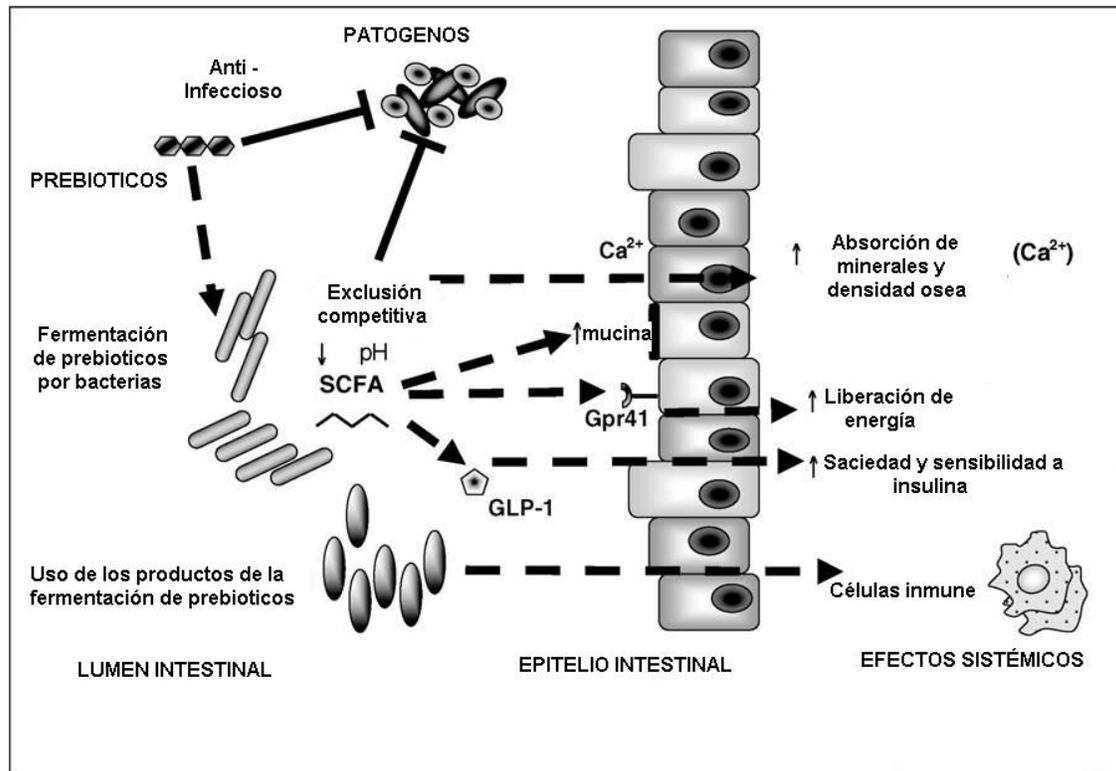


Figura 2. Representación de los roles benéficos de los prebióticos sobre el tracto gastrointestinal de mamíferos y sus efectos sistémicos.

(SCFA ácidos grasos de cadena corta; GLP-1 péptido semejante a glucagón;

Gpr41, Receptor 41 acoplado a la proteína G)

Fuente: Saulnier, et al., 2009.

En relación a la modulación del sistema inmune, los ácidos grasos de cadena corta desempeñan un papel importante, ya que incrementan la producción de mucina y disminuyen la translocación al unirse a receptores de SCFA en las células inmunes que se encuentran en el tejido linfático asociado al tracto intestinal (GALT, por sus siglas en inglés). Se unen a receptores específicos como la proteína G acoplada al receptor 41 (Gpr41), la cual es un regulador del balance de energía del hospedero, cuyos efectos son dependientes de la microbiota. En ratas alimentadas con FOS se observó un aumento del péptido semejante a glucagón (GLP-1) en la vena porta, y de proglucagón en el colon proximal, lo que conlleva a un control de la saciedad y tolerancia a glucosa (Saulnier, et al., 2009).

La absorción de minerales se ve favorecida, pues al fermentarse los prebióticos se acidifica el contenido colónico incrementando la solubilidad de calcio, magnesio y hierro, lo cual favorece su difusión pasiva (Roberfroid, 2000).

El uso de oligosacáridos prevé selectivamente la adhesión de ciertas bacterias por medio de mimetizar sitios de unión, pues actúan de manera semejante a los receptores celulares que unen a patógenos, por ejemplo: GOS reduce la adherencia de *E. coli* enterotoxigénica; sin embargo, el estudio del efecto de prebióticos sobre el desarrollo de patógenos sigue en desarrollo (Saulnier, *et al.*, 2009).

1.3.2. Inulina.

La inulina, β -D-fructopiranosil- $[\beta$ -D-fructofuranosil] $_n$ -1- β -D-fructofuranósido, es un fructano polidisperso, cuyas unidades de fructosa en la mezcla de polímeros lineales y oligómeros se encuentran unidos por enlaces $\beta(2-1)$. La longitud de las cadenas de estos fructanos está en un promedio de 10 a 60 unidades, con un promedio de grado de polimerización (DP) de 10. Una molécula de glucosa reside en el extremo de cada cadena de fructosa unida por un enlace $\alpha(1-2)$, como ocurre en la sacarosa (Figura 3).

Generalmente se presenta una confusión entre el término oligofructosa e inulina. La diferencia entre ellas es el número de residuos presentes en las cadenas, ya que la oligofructosa contiene entre 2 y 10 residuos de monosacáridos unidos por enlaces $\beta(2-1)$. La oligofructosa proveniente de la achicoria contiene cadenas de fructosa (Fm) y cadenas de fructosa con unidades terminales de glucosa (GFn) (Niness, 1999).

El aspecto esencial de la estructura de inulina son sus enlaces $\beta(2-1)$, ya que éstos son responsables de que no sea digerida como un hidrato de carbono típico y por lo tanto de reducir su valor calórico y efectos prebióticos (Mussatto y Mancilla, 2007). Se ha estimado que su consumo en Estados Unidos es en promedio de 1-4 g por día y de 3-10 g/d en Europa a través de los alimentos que consumen en su dieta (Van Loo, *et al.*, 1995). Aunque hay reportes de que el consumo diario en Estados Unidos corresponde a 2.6 g de inulina y 2.5 g de FOS (Tannock, 2002).

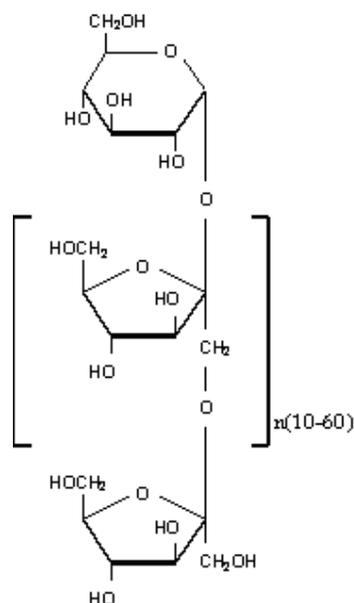


Figura 3. Estructura química de la inulina.

1.3.2.1. Incidencia en la naturaleza y productos manufacturados.

La inulina se encuentra en cerca de 36,000 especies de plantas del género Compositae como fuente de almacenamiento en bulbos, raíces y tubérculos a distintos porcentajes, algunos ejemplos se presentan en la Tabla 5. La principal fuente de inulina es la raíz de achicoria, aunque en los últimos años se han buscado nuevas fuentes como es el caso de la alcachofa, cebollas, ajos y agaves (Roberfroid, 2005).

Tabla 5. Contenido promedio de inulina en diferentes especies vegetales.¹

Especie vegetal	Inulina (g/100g base seca)
Achicoria (<i>Cichorium intybus</i>)	79
Raíz de Dalia (<i>Dahlia spp.</i>)	59
Cebolla (<i>Allium cepa</i> L.)	48
Agave (<i>Agave salmiana</i>)	43
Porro (<i>Allium porrum</i> L.)	37
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	29
Centeno (<i>Secale cereale</i>)	1

¹Fuente: Madrigal, L., Sangronis, E. (2007).

El proceso de obtención de inulina más utilizado es similar al que se utiliza para extraer azúcar de las cañas. Las raíces son cosechadas, lavadas y rebanadas. Debido a su solubilidad en agua caliente, la inulina se extrae por difusión en un proceso de cocción y se purifica por carbonatación acídica (para retirar péptidos) y filtración. Finalmente, se seca por evaporación y/o secado por aspersión (Madrigal y Sangronis, 2007). El producto resultante tiene un DP promedio de 10 a 12 con una distribución de las moléculas con longitudes de cadena de 10-60 unidades y un contenido de 6-10% de azúcares correspondientes a glucosa, fructosa y sacarosa, los cuales se encuentran de manera natural en la raíz (Meijer y Mathijssen, 1993). Existen otros métodos como precipitación con etanol o extracción asistida con ultrasonido para obtener mejores rendimientos y mayor pureza en el producto resultante sin embargo, el escalamiento a nivel industrial resulta costoso (Lyngyun, *et al.*, 2007).

Además de la inulina nativa, se puede encontrar en el mercado inulina de "alta eficiencia" (HP), con un DP de 25 y una distribución molecular de 11 a 60. Tanto los azúcares residuales como los oligómeros han sido removidos. El producto provee casi el doble de las características miméticas grasas con respecto a la inulina estándar y no contribuye al dulzor. En el mercado europeo, principalmente, se puede encontrar una mezcla de oligofructosa y de inulina de cadena larga conocida como Synergy[®] (Niness, 1999).

En el país, la producción de inulina comercial está cobrando importancia como un nuevo mercado para el aprovechamiento de agaves (Roberfroid, 2005). Algunos de los proveedores nacionales de inulina se enlistan en la Tabla 6. Las presentaciones comerciales varían, la forma líquida es ofertada para su adición en bebidas y productos lácteos fermentados o bien, en polvo sugerido para productos de repostería.

Tabla 6. Proveedores nacionales de inulina.

Proveedor	Fuente de obtención	Presentación
Prointer (Productos de inulina internacionales) Cuernavaca, Morelos. http://www.prointer.com.mx/	Agave	Polvo y líquida
América Alimentos. Zapopan, Jalisco. http://www.americaalimentos.com/	Achicoria y agave	Polvo
Olatli, SRL. Singuilucan, Hidalgo. http://www.olatli.com.mx/productos.htm	Agave	Polvo
Industrializadora Integral de Agave S.A. de C.V. Tlaquepaque, Jalisco. http://www.iidea.com.mx/inulina.htm	Agave	Polvo y líquida
Tenoch. Endulzantes y Alimentos funcionales. Guadalajara, Jalisco. http://agavetenoch.com/	Agave	Polvo

1.3.2.2. Propiedades funcionales.

La diferencia en la longitud de la cadena entre la oligofructosa y la inulina confiere propiedades funcionales distintas. La oligofructosa al ser de cadena corta presenta características funcionales similares a la sacarosa y al jarabe de glucosa, por lo que se emplea para humectar y proporcionar cohesividad a productos de repostería e incluso, se adiciona como edulcorante para sustituir o disminuir el uso de edulcorantes artificiales. Debido a que la inulina tiene la capacidad de formar microcristales cuando se mezcla con agua o leche, se ha utilizado con éxito para reemplazar grasas en untables, productos de repostería, rellenos, productos lácteos y aderezos. Dichos cristales no son perceptibles en la boca, pero interactúan para formar una textura cremosa y dar una sensación en la boca semejante a la producida por consumo de grasas (Roberfroid, 2000). Algunas de las aplicaciones de la inulina en la industria alimentaria se enlistan en la Tabla 7.

Actualmente es utilizada para adicionar fibra a gran variedad de productos alimenticios, ya que a diferencia de otras fibras, no tienen sabores residuales y se puede adicionar a los productos sin contribuir a la viscosidad (Roberfroid, 2005).

Tabla 7. Propiedades funcionales de la inulina y sus derivados.¹

Aplicación	Funcionalidad
Productos lácteos	Cuerpo y palatabilidad, emulsificante, sustituto de azúcares y grasas, sinergismo con edulcorantes.
Postres congelados	Textura, depresión en el punto de congelación, sustituto de azúcares y grasas, sinergismo con edulcorantes.
Productos untables	Estabilidad de emulsión, textura, sustituto de grasas.
Productos horneados	Sustituto de azúcares.
Cereales de desayuno	Capacidad de expansión.
Preparación con frutas (no ácidas)	Cuerpo y palatabilidad, emulsificante, sustituto de azúcares y grasas, sinergismo con edulcorantes.
Aderezos de ensaladas	Cuerpo y palatabilidad, sustituto de grasas.
Productos cárnicos	Textura, estabilidad de emulsión, sustituto de grasas.
Chocolates	Sustituto de azúcares, humectante.

¹Madrigal y Sangronis, 2007.

1.3.2.3. Propiedades nutricionales.

Las propiedades de la inulina más sobresalientes son las relacionadas a aspectos nutricionales, entre las que se encuentran:

1. Valor calórico.

Posee un bajo valor calórico, debido a sus enlaces $\beta(2-1)$ que no son degradados por las enzimas digestivas y por lo tanto no son metabolizados. La energía derivada de su fermentación es el resultado de la producción de ácidos grasos de cadena corta y lactatos, los cuales son metabolizados y contribuyen con 1.5 cal/g. Aunado a que se considera un edulcorante sinergista al mezclarse con otros edulcorantes sintéticos (Carabin y Flamm, 1999). Por esta razón en muchos países se ha utilizado para reemplazar grasas o azúcares y reducir las calorías en productos lácteos, confitería y repostería, incluso en alimentos para diabéticos (Niness, 1999).

2. Estimulación de la microbiota benéfica.

A partir de los criterios señalados en la descripción del concepto de prebióticos, se ha encontrado que efectivamente, la inulina es resistente a procesos digestivos y se considera un oligosacárido no digerible que, para efecto de etiquetado, se clasifica como fibra dietética. Los resultados *in vitro* sostienen la estimulación selectiva de crecimiento bacteriano por la inulina. Esto se ha demostrado en fermentación de cultivos puros y con inóculos fecales en fermentaciones en lotes y en continuo. Al igual que en los ensayos *in vitro*, los estudios *in vivo* han demostrado un efecto bifidogénico en ratas alimentadas con inulina y menor número de *Clostridium* (Gibson, *et al.*, 2004).

Los ensayos con humanos empleando oligofruktosa y/o inulina incluyen aquellos con dietas controladas y ensayos de alimentación cruzada, aunque la dosis, el sustrato, la duración y el número de voluntarios han variado como lo muestra la Tabla 8.

La eficiencia de la inulina también se ha evaluado en su incorporación en fórmulas infantiles observando un incremento en bifidobacterias y lactobacilos en niños que han recibido fórmula láctea suplementada con una mezcla de inulina y galacto-oligosacáridos, indicando su alta viabilidad para su uso en nutrición infantil (Rinne, M., 2005).

Cabe destacar que los cambios originados por la inclusión de prebióticos están en función del contacto con el prebiótico, de lo contrario al dejar de consumirse, se pierden los efectos benéficos sobre la carga microbiana benéfica (FAO, 2007; Azorín-Ortuño, *et al.*, 2009).

3. Relación con efectos sistémicos.

a) Lípidos en sangre. Estudios en ratas han demostrado que el empleo de inulina en un 10% de la dieta disminuye la síntesis hepática de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad. Además, previene el incremento de síntesis hepática de triglicéridos después de consumir fructosa. También se han observado disminución de los niveles de colesterol y fosfolípidos en sangre. El mecanismo exacto aún no está completamente dilucidado, se sugiere que los ácidos grasos de cadena corta generados por su fermentación modulan la síntesis de colesterol (Jenkins, *et al.*, 1999).

Tabla 8. Estudios en humanos del efecto prebiótico de inulina.¹

Estudio	Observaciones en medios de cultivo selectivos	Referencias
8 voluntarios administrados con 15g oligofruktosa/día durante 15 días. Posteriormente, 4 de ellos fueron administrados con 15g inulina/día por 15 días.	Para la oligofruktosa: ↑ bifidobacterias y ↓ <i>Bacteroides</i> . Para la inulina: ↑ bifidobacterias y ↓ cocos Gram positivos	Gibson <i>et al.</i> (1995)
10 mujeres administradas con 20 y 40g de inulina/día.	↑ en bifidobacterias y ↓ <i>Bacteroides</i>	Kleessen <i>et al.</i> (1997b)
8 voluntarios consumieron inulina hidrolizada de achicoria (8g/día)	↑ en las bifidobacterias fecales	Menne <i>et al.</i> (2000)
8 sujetos fueron administrados con 34 g inulina/día durante un periodo de dos meses	↑ de bifidobacterias durante el periodo de estudio	Kruse <i>et al.</i> (1999)
10 adultos de 40 años administrados con 9 g inulina/ día durante 15 días	↑ bifidobacterias y ↓ <i>Eubacterium</i>	Harmsen <i>et al.</i> (2002)
14 voluntarios en estudio paralelo: 7 de ellos administrados con 13 g de inulina/día de inulina y 7 con pentosano en pan	↑ productos de fermentación con pentosano que con inulina	Grasten, <i>et al.</i> (2003)

Fuente: Grasten, *et al.*, 2003; Gibson, *et al.*, 2004.

b) Amoníaco en sangre y urea sérica. La disminución de amoníaco en sangre y urea sérica está asociada con el crecimiento de biomasa colónica y fijación de nitrógeno por los microorganismos, acoplado con la acidificación del medio y conversión de amoníaco a amonio (Gibson, *et al.*, 1995).

c) Absorción de minerales. La absorción y balance de minerales se ve mejorada con el consumo de inulina, posiblemente por el aumento en el efecto osmótico, el cual incrementa la transferencia de agua al lumen, permitiendo la solubilización de los minerales. Aunado a la acidificación del medio por la fermentación bacteriana, se incrementa la concentración de la forma ionizada de los minerales (Carabin y Flam, 1999). Avances recientes en este campo muestran que los fructanos tipo inulina

aumentan la absorción de calcio por la mucosa colónica en humanos (Saulnier, *et al.*, 2009).

1.3.2.4. Tolerancia en el organismo.

Como se mencionó anteriormente, a pesar de la similitud estructural la inulina y la oligofructosa tienen efectos diferentes en cuanto a la tolerancia en el organismo debido a la longitud de sus cadenas. Generalmente, los síntomas relacionados con su tolerancia son gastrointestinales como flatulencia, inflamación y distensión abdominal. En el caso de la inulina (con un DP promedio de 10) tienen una mejor tolerancia gastrointestinal debido a que su fermentación por los microorganismos es más lenta que la de la oligofructosa (Kaur y Gupta, 2002).

La inulina, administrada por vía intravenosa como una solución estéril, se ha utilizado por muchos años como un agente diagnóstico para medir la velocidad de filtración glomerular (GFR, por sus siglas en inglés). La concentración de inulina es similar tanto en plasma como en el filtrado glomerular de individuos sanos, ya que por su peso molecular atraviesa la membrana glomerular. Es un compuesto ideal para las pruebas de aclaramiento renal ya que es filtrada por el glomérulo, no es absorbida o excretada por los túbulos renales y no es metabolizada. La inulina administrada a dosis de 50 mg/kg no causa efectos adversos o toxicológicos (Haller, *et al.*, 1998; Carabin y Flamm, 1999).

2. HIPÓTESIS.

Si la microbiota intestinal se ve disminuida ante un cuadro de desnutrición grave desarrollado en ratas jóvenes, entonces la adición de inulina en las dietas de recuperación tendrá un efecto favorecedor en la microbiota colónica de los animales.

3. OBJETIVOS.

Objetivo General.

- ❖ *Evaluar el efecto de la adición de inulina a dietas de recuperación sobre la microbiota intestinal de ratas jóvenes con desnutrición grave.*

Objetivos Particulares.

- ❖ *Desarrollar un cuadro de desnutrición grave Kwashiorkor en ratas recién destetadas mediante una dieta con proteínas de baja eficiencia de conversión.*
- ❖ *Determinar la concentración de proteínas plasmáticas en animales desnutridos como parámetro bioquímico de su estado nutricional.*
- ❖ *Evaluar la recuperación de los animales desnutridos a través de los siguientes parámetros: velocidad de crecimiento y masa metabólica activa.*
- ❖ *Comparar el contenido de bifidobacterias, enterobacterias, lactobacilos y anaerobios totales en heces del grupo desnutrido con respecto al grupo testigo.*
- ❖ *Conocer los cambios en el contenido de los grupos de microorganismos seleccionados en heces de los grupos estudiados debido a la adición de inulina en la dieta con respecto a los grupos testigo.*

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

El estudio se llevó a cabo con dos grupos de animales: desnutrido y testigo, en dos fases de experimentación. El desarrollo del cuadro de desnutrición y su respectivo testigo, correspondió a la fase I con una duración de 30 días. En la fase II tuvo lugar la recuperación de los animales desnutridos, administrando en la dieta dos concentraciones de inulina: 2 y 4%, por un lapso de 60 días, y el mantenimiento de los grupos testigo. En la Figura 4 se muestra el diagrama general de la parte experimental.

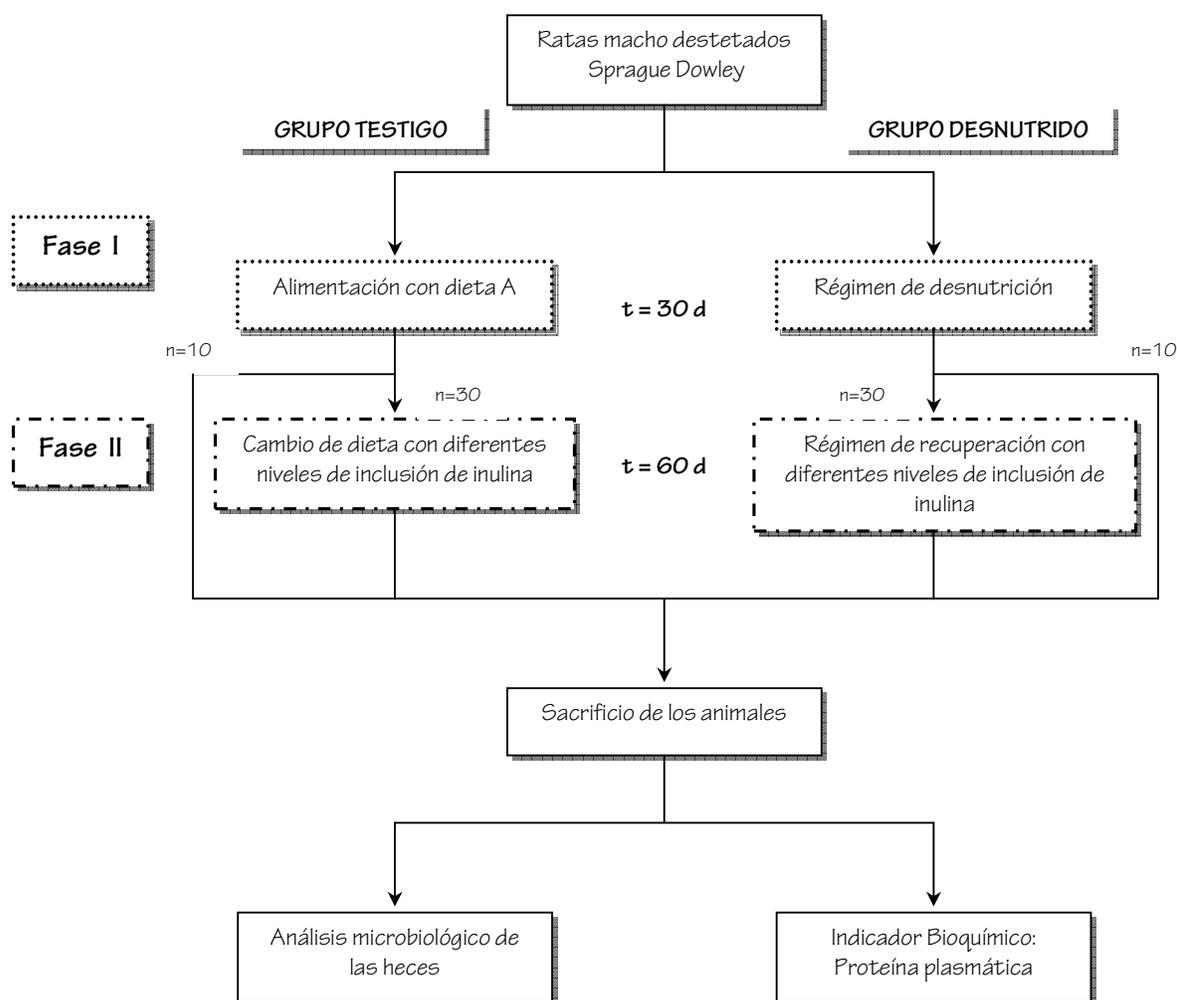


Figura 4. Diagrama general del desarrollo experimental.

(n= número de animales; t= duración de la fase)

Para fines de simplificación, el desarrollo experimental se dividirá en dos partes: 1) Ensayo biológico y 2) Análisis microbiológico de las heces y cuantificación de proteínas plasmáticas.

4.1 Ensayo biológico.

4.1.1. Dietas.

Las dietas seleccionadas para el periodo de desnutrición de los animales fueron las propuestas por González-Hernández, *et al.* (2008). En dicho estudio, los animales testigo fueron alimentados con una dieta suficiente en nutrimentos y energía, a base de caseína y leche en polvo 50:50 (con respecto a la proteína), mientras que los animales desnutridos fueron alimentados con una dieta cuya fuente de proteína fue una mezcla de harina de maíz: grenetina: leche en polvo en una proporción 47:43:10.

La composición proximal teórica e ingredientes de las dietas empleadas se presentan en la Tabla 9. La dieta A corresponde a la administrada al grupo testigo y la dieta B, la utilizada para lograr el cuadro de desnutrición.

Durante la fase II se utilizó la dieta A como base, excepto en el contenido de celulosa, el cual se modificó para incorporar el porcentaje de inulina a probar: 2 y 4%, las cuales equivalen a las dietas C y E, respectivamente. La dieta A fungió como testigo y no se le adicionó inulina. Con lo anterior, se mantuvieron las dietas isoproteínicas e isoenergéticas. Los ingredientes utilizados y la composición teórica de las dietas empleadas en el periodo de recuperación se muestran en la Tabla 10. Todas las dietas empleadas durante el ensayo biológico fueron almacenadas en refrigeración.

La selección de los niveles de inclusión de inulina en las dietas se realizó considerando que los cuadros de desnutrición grave están asociados con problemas en el funcionamiento gastrointestinal como baja absorción de nutrimentos por el daño presente en las vellosidades del borde en cepillo y aumento en la permeabilidad intestinal (Lagrutta, F., 1995; Kerac, *et al.*, 2009). En la revisión realizada por Gibson *et al.* en 1995, se relacionaron altos niveles de prebióticos con dolores abdominales agudos e inflamación abdominal. Dado lo anterior, se propuso manejar dos niveles bajos de inulina, 2 y 4%, y establecer cual de ellos ofrecía una mejor respuesta en la recuperación de la flora microbiana estudiada.

Tabla 9. Composición de las dietas empleadas en la fase I del ensayo biológico (g/kg).

Ingrediente	Dieta A	Dieta B
Caseína (89.2% prot) ¹	84.3	-
Leche en polvo ²	285.2	49.7
Harina de maíz ³	-	641.8
Grenetina ⁴	-	56.7
Sacarosa	159.6	35.8
Dextrosa	181.4	39.8
Dextrina ⁵	137.8	30.9
Manteca vegetal ⁶	36.4	57.7
Aceite de maíz ⁷	27.3	42.8
Celulosa ⁸	45.9	-
Mezcla de vitaminas ⁹	20	20
Mezcla de minerales ¹⁰	22.1	24.8
Análisis composicional		
Proteína	150	130
Extracto etéreo	140	140
Cenizas	60	40
Fibra	60	80
Hidratos de carbono	590	590
Energía (MJ/kg)	17.7	17.3

¹ ICN Pharmaceutical 901293. ²Nido[®] ³Maseca[®] ⁴Knox[®] ⁵Maizena[®] ⁶Inca[®] ⁷Mazola[®] ⁸Sigma

⁹ICN Pharmaceutical 904654. ¹⁰Mezcla Roger-Harper, ICN 902842.

Tabla 10. Composición de las dietas empleadas en la fase II del ensayo biológico (g/kg).

Ingrediente	Dieta A	Dieta C	Dieta E
Inulina de achicoria ¹	-	20	40
Caseína (89.2% prot) 2	84.3	84.3	84.3
Leche en polvo ³	285.2	285.2	285.2
Harina de maíz ⁴	-	-	-
Grenetina ⁵	-	-	-
Sacarosa	159.6	159.6	159.6
Dextrosa	181.4	181.4	181.4
Dextrina ⁶	137.8	137.8	137.8
Manteca vegetal ⁷	36.4	36.4	36.4
Aceite de maíz ⁸	27.3	27.3	27.3
Celulosa ⁹	45.9	25.9	5.9
Mezcla de vitaminas ^{a10}	20	20	20
Mezcla de minerales ¹¹	22.1	22.1	22.1
Análisis composicional			
Proteína	150	150	150
Extracto etéreo	140	140	140
Cenizas	60	60	60
Fibra	60	60	60
Hidratos de carbono	590	590	590
Energía (MJ/kg)	17.7	17.7	17.7

¹América Alimentos ²ICN Pharmaceutical 901293 ³Nido® ⁴Maseca® ⁵Knox® ⁶Maizena® ⁷Inca® ⁸Mazola®

⁹Sigma ¹⁰ICN Pharmaceutical 904654. ¹¹Mezcla Roger-Harper, ICN 902842.

4.1.2. Diseño del ensayo biológico.

Para el ensayo biológico se planteó un diseño de bloques al azar para facilitar el manejo de los animales y el análisis de las muestras. El bloque 1 correspondió al grupo testigo mientras que el bloque 2 al grupo desnutrido. Para cada bloque se emplearon 40 ratas macho recién destetadas de la cepa Sprague-Dawley (Harlan, México), con un peso promedio de 40 ± 5 g.

Los animales pertenecientes al bloque 1 se distribuyeron aleatoriamente entre los siguientes cuatro grupos:

- T, correspondiente al testigo de la fase I
- TA, alimentado con la dieta A tanto en la fase I como II
- TC, durante la fase I se alimentó con dieta A y para la fase II con la dieta al 2% de inulina
- TE, durante la fase I se alimentó con dieta A y para la fase II con la dieta al 4% de inulina.

Para el bloque 2 la distribución aleatoria de los animales fue la siguiente:

- K, correspondiente al grupo desnutrido de la fase I
- KA, desnutrido en la fase I y recuperado durante la fase II con la dieta A
- KC, desnutrido en la fase I y recuperado durante la fase II con la dieta al 2% de inulina
- KE, desnutrido en la fase I y recuperado durante la fase II con la dieta al 4% de inulina.

La fase I se mantuvo por 30 días con el fin de lograr un cuadro de desnutrición grave kwashiorkor en el bloque 2. El periodo de recuperación se siguió por 60 días con el fin de evaluar si en dicho tiempo se lograba tanto la recuperación de los animales desnutridos como el efecto prebiótico de la inulina presente en las dietas de recuperación.

El manejo de animales se realizó siguiendo el protocolo de Uso y Cuidado de Animales del Bioterio del conjunto E de la Facultad de Química. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales bajo condiciones estándar: temperatura de $19-22^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de 31-60% y ciclos de luz/oscuridad de 12 h. En todos los casos, se proporcionó a los animales agua y alimento *ad libitum*. El peso corporal y alimento consumido se registraron dos veces por semana.

De acuerdo con el diseño, al finalizar cada fase se realizó la toma de muestras biológicas. Para la fase I se sacrificaron los grupos T y K, a los 30 días del ensayo. El resto de los grupos se sacrificó al término del bioensayo (90 días). Se obtuvieron muestras de sangre para determinar

proteínas plasmáticas y heces para caracterizar la flora microbiana. Debido a que el análisis microbiológico debía realizarse en un lapso no mayor a dos horas, se sacrificó un animal de cada grupo al día.

4.1.3. Parámetros de crecimiento y aprovechamiento de alimento.

A partir de los datos de peso corporal y alimento consumido se determinaron distintos parámetros para establecer el grado de desnutrición y recuperación de los animales:

- *Velocidad de crecimiento (VC) cada 30 días para evaluar los cambios en la pendiente de la curva de crecimiento. Dicho parámetro se calculó como la diferencia entre el peso final y el inicial dividido por el número de días entre cada evaluación del parámetro, es decir, 30 días. Para la velocidad de crecimiento de la fase I (VC₃₀) los valores empleados para el cálculo fueron el peso de los animales recién destetados, el peso al término de la fase I y como número de días, 30. En el caso de la VC después del primer mes del periodo de recuperación de los animales desnutridos y mantenimiento de los animales testigo (VC₆₀), se consideró el peso al término de la fase I (peso inicial), peso a los 30 días de la fase II (peso final), y nuevamente como número de días, 30. Finalmente, para la VC al término de la fase II (VC₉₀), los valores empleados como peso inicial fue el peso a los 60 días, el peso final fue a los 90 días, y el tiempo fue de 30 días.*
- *Eficiencia de conversión alimenticia (ECA) cada 30 días de experimentación. LA ECA es un indicador de que tan adecuado es al aprovechamiento del alimento por el animal y se calculó considerando el alimento consumido dividido por el incremento en peso corporal del periodo a evaluar. Por ejemplo, para evaluar la ECA₆₀ se manejaron en el cálculo el alimento consumido y el peso corporal entre los 30 y 60 días de estudio.*
- *Consumo de energía y consumo de proteína en términos de masa metabólicamente activa, expresados como $\text{kJ}/\text{kg}_{\text{p.c.}}^{0.73} \cdot \text{día}$ y $\text{g}/\text{kg}_{\text{p.c.}}^{0.73} \cdot \text{día}$, respectivamente, con el fin de establecer el tipo de desnutrición obtenida.*

4.2. Análisis de las muestras de sangre y heces.

4.2.1. Obtención de las muestras biológicas.

Material y equipo.

- Equipo de disección estéril
- Tubos de centrifuga cónico de 15 ml con tapa
- Tubos eppendorf
- Matraz aforado de 100 mL
- Balanza analítica Sartorius Modelo A210P
- Centrifuga IEC
- Ultracongelador marca REVCO

Reactivos.

- Citrato de sodio dihidratado R.A. Merck 507140
- Ácido cítrico anhidro R.A. Sigma C8385
- Dextrosa R.A. JT Baker Merck 20123

Preparación de disoluciones.

- Disolución de citrato-ácido cítrico y dextrosa. Se disolvieron 2.2 g de citrato de sodio dihidratado, 2.45 g de dextrosa y 0.73 g de ácido cítrico anhidro en agua destilada, se colocaron en un matraz aforado de 100 mL y se llevó al aforo.

Los animales fueron anestesiados en una cámara con éter etílico y se realizó una incisión en la vena yugular para obtener la sangre, la cual se recibió en un tubo de centrifuga con solución CAD como anticoagulante. El plasma se obtuvo después de centrifugar las muestras a 2000 rpm por 15 minutos, y se almacenó a -52°C para su posterior análisis.

Para la colecta de heces se diseccionaron los animales y se extrajo la última porción del intestino grueso (colon descendente) y el recto. Posteriormente, se realizó un corte longitudinal para retirar las heces con ayuda de las pinzas de disección en sentido ascendente, es decir, primero se colectaron las heces que se localizaban en el recto y finalmente, las que se

encontraban en el colon descendente. Una vez colectadas, se depositaron en tubos eppendorff previamente pesados y esterilizados. El análisis microbiológico se realizó de inmediato.

4.2.2. Cuantificación de proteínas plasmáticas por el método de Lowry.

Se cuantificó el contenido de proteínas plasmáticas totales con las modificaciones al método de Lowry reportadas por Bergmeyer (1996).

Material y equipo.

- Matraces volumétricos de 10, 100 y 1000 mL
- Probeta graduada de 100 mL
- Pipetas automáticas (200, 1000 μ L y 1-5 mL)
- Tubos de ensayo de 16 x 150 mm
- Tubos eppendorff
- Balanza analítica Sartorius Modelo A 210 P
- Vórtex (Mistral-mixer, Lab-line)
- Espectrofotómetro Genesys 10UV Scanning. Thermo Scientific

Reactivos

- Albúmina sérica bovina R.A. Sigma A4503
- Hidróxido de sodio R.A.
- Tartrato disódico \cdot 2H₂O R.A.
- Carbonato de sodio R.A.
- Sulfato de cobre \cdot 5H₂O R.A.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu R.A. Sigma F9252

Preparación de disoluciones

- Disolución estándar de albúmina sérica bovina (1mg/mL). Se pesaron 10.43 mg de Albúmina sérica bovina, los cuales se aforaron cuidadosamente para evitar la formación de burbujas a un volumen final de 10 mL con agua destilada. Se almacenó en alícuotas de 1 mL a -52°C.

- Disolución de hidróxido de sodio (0.8 M)
- Reactivo A. Se disolvieron 0.2g de tartrato disódico dihidratado y 10g de carbonato de sodio en 69mL de NaOH 0.8 M, se llevó a un volumen final de 100 mL con agua destilada.
- Reactivo B. Se disolvieron 2g de tartrato disódico dihidratado y 1g de sulfato de cobre pentahidratado en 12.5 mL de NaOH 0.8M, se llevó a un volumen final de 100mL con agua destilada. Se almacenó protegido de la luz.
- Reactivo Mezcla. Se mezclaron 25 volúmenes de la solución de NaOH 0.8 M con 18 volúmenes del reactivo A y 2 volúmenes del reactivo B. Este reactivo se preparó antes de su uso.
- Reactivo C. Se diluyó un volumen del reactivo comercial de Folín-Ciocalteu con 2 volúmenes de agua destilada, justo antes de su uso.

Preparación de la curva de calibración. La solución de albúmina sérica bovina de 1mg /mL se diluyó 1:10 en un matraz aforado para obtener una solución de 100 µg/mL. Posteriormente de dicha solución se tomaron alícuotas de 0.4, 0.8, 1.6, 2.4 y 3.2 mL y se llevaron a un volumen final de 4mL con agua destilada, obteniendo concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 µg/mL, respectivamente.

De cada una de las soluciones preparadas (incluyendo la de 100 µg/mL) se colocaron 1.2 mL en un tubo de ensaye y se adicionaron a cada tubo 0.9 mL de reactivo Mezcla y se agitaron en vórtex por 10 segundos. Posteriormente se añadieron 0.6 mL de reactivo C y se agitaron 10 segundos y se añadieron nuevamente 0,6 mL de reactivo C. Después de agitar vigorosamente, se incubaron por 45 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Transcurrido dicho tiempo se ajustó el espectrofotómetro con el primer punto de la curva, y se midieron las absorbancias de los demás puntos a 750 nm.

Método analítico para la cuantificación de proteínas plasmáticas: En un tubo de ensaye se colocaron 1.2 mL de la muestra de plasma previamente diluida (la concentración de la muestra debía estar entre 10 y 100 µg/ mL), se añadieron 0.9 mL del reactivo Mezcla y se agitaron en vórtex por 10 segundos. A continuación se adicionaron 0.6 mL de reactivo C y se agitó inmediatamente en vórtex por 10 segundos y nuevamente se adicionaron 0.6 mL de reactivo C.

Después de agitar vigorosamente, se incubó por 45 minutos protegido de la luz a temperatura ambiente. A la par se preparó un blanco de reactivos utilizando agua destilada en lugar de muestra, siguiendo el mismo procedimiento. Transcurrido dicho tiempo se midió la absorbancia tanto del blanco como de la muestra a una longitud de onda de 750 nm.

La respuesta de la muestra se interpoló en la curva de calibración elaborada con albúmina sérica bovina. El valor interpolado se multiplicó por el factor de dilución y se convirtió de microgramos a miligramos para reportar la concentración de proteína en mg/mL de plasma.

4.2.3. Análisis microbiológico de heces.

A continuación se mencionan los reactivos, material y equipo necesarios para la preparación de medios y diluciones de las heces.

Material y equipo.

- Matraces Erlenmeyer de 125, 250 y 500 mL
- Probetas graduadas de 250 y 500 mL
- Pipeta graduada de 1 y 5 mL
- Vasos de precipitados de 500 y 1000 mL
- Matraz aforado de 500 mL
- Pipeta automática Eppendorf de 1 mL
- Puntas para micropipeta estériles
- Tubos de ensaye con tapón de rosca de 13 x 100 mm
- Pipeta graduada de 5 y 10 mL
- Propipeta
- Agitadores magnéticos
- Cinta testigo Tuk
- Potenciómetro Corning 430
- Parrilla de calentamiento con agitación magnética Corning
- Autoclave

Reactivos.

- Agar Mac Conkey Bioxon Lote 7187558
- Agar MRS (de man, Rogosa, Sharpe) Oxoid Lote 517738
- Agar Wilkins-Chalgren Oxoid Lote 461202
- Caldo corazón-cerebro deshidratado Bacto BD Lote 7187558
- Glucosa R.A. Merck 20123
- Citrato férrico R.A. Sigma F6129
- Clorhidrato de cisteína R.A. Sigma 7048
- Ácido propiónico R.A. Aldrich 1386
- Hidróxido de sodio R.A.
- Cloruro de sodio R.A.
- Cloruro de potasio R.A.
- Cloruro de calcio·2H₂O R.A.
- Carbonato de sodio R.A.
- L-cisteína R.A. Sigma C7352

Medios de cultivo.

- Agar MRS para lactobacilos, Agar Mac Conkey para enterobacterias y Agar Wilkins-Chalgren para anaerobios totales. Los medios se prepararon de acuerdo a las indicaciones de cada proveedor y fueron esterilizados a 121°C por 15 minutos antes de ser utilizados.
- Caldo Beerens selectivo para bifidobacterias (Beerens, 1991). Se disolvieron 37g de caldo cerebro corazón deshidratado, 5 g de glucosa, 0.5 g de citrato férrico, 0.5 g de clorhidrato de cisteína en 950 mL de agua destilada. Se calentó a ebullición y se dejó enfriar a 40-60°C para adicionarle 5 mL de ácido propiónico. Se ajustó el pH a 5 con una solución de NaOH 2N. Finalmente, se llevó a un volumen de 1000 mL con agua destilada y se esterilizó a 121°C por 15 minutos.

Preparación de disoluciones.

- Disolución Ringer-Cisteína. Se disolvieron 2.25 g de cloruro de sodio, 0.105 g de cloruro de potasio, 0.159 g de cloruro de calcio, 0.05 g de carbonato de sodio y 0.30 g de L-

cisteína en 950 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a $7,00 \pm 0,02$ y se llevó a un volumen final de 1000 mL. Se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Nota: Los análisis microbiológicos se trabajaron en condiciones de asepsia dentro de una campana de flujo laminar Marca Veco.

4.2.3.1. Cuantificación de lactobacilos, enterobacterias y anaerobios totales por cuenta en placa (NOM-092-SSA1-1994).

Material y equipo.

- Tubos de ensaye con tapón de rosca de 13 x 100 mm
- Cajas Petri estériles
- Pipeta automática Eppendorf de 1 mL
- Puntas para micropipeta estériles
- Jarras de anaerobiosis Oxoid Modelo AnaeroGen AN25
- Sobres para anaerobiosis Oxoid AnaeroGen AN0025A
- Incubadora Blue M. con temperatura controlada
- Cuenta colonias

Para la preparación de las diluciones se etiquetaron tubos estériles del 1 al 12 y se adicionaron a cada uno de ellos, 9 mL de solución Ringer-cisteína para mantener las condiciones de anaerobiosis. Se pesó 1g de heces y se transfirió al tubo 1, se homogeneizó con ayuda de una varilla de vidrio estéril hasta lograr la dispersión total de la muestra. Finalmente se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-12} . Cuando no se contó con 1 g de heces, se consideró el peso para realizar las diluciones seriadas.

Una vez realizadas las diluciones, se tomó 1 mL de la dilución más alta con una punta limpia y estéril y se colocó en el centro de la caja Petri marcada con la dilución correspondiente. En una segunda caja se colocó 1 mL de la misma dilución, correspondiente a la réplica de la dilución, y se desechó la punta,

El procedimiento anterior se repitió para el resto de las diluciones señaladas en la Tabla 11, de acuerdo al microorganismo a cuantificar y al grupo de animales al cual pertenecía la muestra.

Tabla 11. Diluciones utilizadas para la cuenta en placa.

Grupo	Medio Wilkins-Chalgren	Medio MRS	Medio Mac Conkey
T, TA, TC, TE, KE	10^{-7} - 10^{-9}	10^{-7} - 10^{-9}	10^{-2} - 10^{-5}
K, KA, KC	10^{-7} - 10^{-9}	10^{-6} - 10^{-8}	10^{-2} - 10^{-4}

A cada caja inoculada se le añadieron de 15 a 20 mL del medio previamente fundido y mantenido a una temperatura de 50°C. Se dejó solidificar el medio, se invirtieron las cajas y se incubaron de acuerdo a la Tabla 12. En el caso de requerir condiciones de anaerobiosis, se colocaron las placas en la jarra de anaerobiosis y se introdujo un sobre de anaerobiosis como lo indica el proveedor.

Tabla 12. Condiciones de incubación de los microorganismos.

Microorganismo	Medio de Cultivo	Condiciones de Anaerobiosis	Temperatura de Incubación (°C)
Anaerobios totales	Wilkins-Chalgren ^a	✓	37
Lactobacilos	MRS ^a	✓	37
Enterobacterias	Mac Conkey ^b	✗	37

^aBD Bioxon. ^bDIFCO.

Después de transcurridas 48 h de incubación, se seleccionaron las placas que mostraban entre 25 y 250 colonias (ver Anexo A). Se colocaron en la cámara cuenta colonias y se registró el número de colonias y la dilución correspondiente.

Para obtener las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g de heces) se consideró el peso de las heces, la dilución y el número de colonias contadas y finalmente, se realizó un promedio de las dos réplicas. Los resultados fueron transformados a escala logarítmica base 10 (log UFC/g) para su discusión.

4.2.3.2. Cuantificación de bifidobacterias por el método del número más probable.

Material y equipo.

- Tubos de ensaye con tapón de rosca de 13 x 100 mm
- Pipeta automática Eppendorf de 1 mL
- Puntas para micropipeta estériles
- Incubadora Blue M con temperatura controlada

- Cuenta colonias

Las diluciones utilizadas para la cuantificación de bifidobacterias se presentan en la Tabla 13, según el grupo de animales al cual pertenecía la muestra. Por cada dilución se marcaron cinco tubos, a cada uno de ellos se le adicionó 1 mL de la correspondiente dilución. Se evitó que la punta de la pipeta tocara el medio y se desechó después de su uso. Una vez inoculados los tubos se incubaron a 37°C por 48 h.

Tabla 13. Diluciones empleadas para el método del Número Más Probable.

Grupo	Diluciones
T	10^{-6} - 10^{-9}
K	10^{-5} - 10^{-8}
TA, TC, KA, KC	10^{-7} - 10^{-10}
TE, KE	10^{-8} - 10^{-12}

Para calcular el NMP/g de heces, primero se determinó el número característico, para ello se seleccionó como p^1 la dilución más baja en la que todos o el mayor número de tubos dieron positivos; p^2 y p^3 correspondieron a los tubos positivos en las siguientes dos diluciones. Se consideró prueba positiva cuando se observó turbidez en el medio de cultivo (Ver Anexo A).

Con ayuda de la tabla de NMP (Anexo B) se localizó el número característico, con lo que se obtuvo la cantidad de microorganismos inoculados en la dilución intermedia de las tres consideradas. Se multiplicó el NMP así obtenido por el recíproco de la dilución intermedia y se expresó como NMP/g de heces. Finalmente, los datos fueron transformados a escala logarítmica base 10 (\log NMP/g) para su discusión.

4.3. Análisis Estadístico.

Los resultados se expresaron como promedio con su desviación estándar, y se verificó que fueran homocedásticos con una prueba de Levene. Las curvas de crecimiento se presentan como valores promedio con su error estándar de la media (ESM). Los resultados de velocidad de

crecimiento, consumo de alimento y proteínas plasmáticas correspondientes de la fase I se compararon por medio de una prueba t-student.

Para establecer comparaciones entre los diferentes grupos testigo y desnutrido de los parámetros obtenidos en la fase II se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de rangos múltiples de Duncan. Se estableció como diferencia significativa $p < 0.05$. El paquete estadístico utilizado fue Statgraphics plus 5.1.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Ensayo biológico.

5.1.1. Fase I. Desarrollo del cuadro de desnutrición.

Las dietas comúnmente utilizadas para lograr cuadros de desnutrición animal manejan bajos porcentajes de proteína, entre 0.5-5%, generando la desnutrición en lapsos de 10-20 días de experimentación (Rossi, *et al.*, 1986; Dock, *et al.*, 2004). Sin embargo, la restricción severa de proteína y/o alimento provoca cambios significativos en el comportamiento de los animales como irritabilidad y ansiedad, dificultando su manejo (Almeida, *et al.*, 2001). Es por ello que se seleccionó la dieta propuesta por González-Hernández, *et al.* (2008), la cual incorpora materias primas que son de fácil acceso, con un aporte del 13% de proteínas de baja eficiencia de conversión y energía proporcionada principalmente por hidratos de carbono.

La dieta contiene harina de maíz que es una proteína de baja conversión pues posee un bajo contenido de lisina y triptofano, este último también se encuentra deficiente en la gnetina y a pesar de que se incorpora 5% de leche en polvo, la mezcla final se mantiene de baja eficiencia de conversión. Con estas características, la dieta simula el tipo de alimentación al cual se someten los niños que presentan kwashiorkor: dietas con contenido adecuado o alto de hidratos de carbono acompañado de proteínas con baja eficiencia de conversión (Touissant y García-Aranda, 2001).

Los resultados obtenidos al emplear esta dieta se presentan en la Figura 5. En ella se puede observar el crecimiento del grupo testigo (T) y del grupo desnutrido (K) en función del tiempo. El grupo T recibió una dieta suficiente en nutrimentos y con la cantidad de proteína y energía recomendada para su crecimiento (Sharp, 1998), razón por la cual presentó la ganancia en peso esperada.

En el caso de los animales sometidos al régimen de desnutrición el peso corporal es significativamente menor con respecto al testigo. Un ejemplo del aspecto de un animal desnutrido se presenta en la Figura 6.

La Tabla 14 presenta el peso inicial y final así como la velocidad de crecimiento de ambos grupos al término de las cuatro semanas de experimentación. La disminución en el peso corporal del grupo desnutrido con respecto al testigo fue de 70.4%. Se observó el impacto de la baja

eficiencia de conversión de dos de las fuentes de proteína en la dieta, ya que la velocidad de crecimiento en el grupo desnutrido fue diez veces menor que en el testigo.

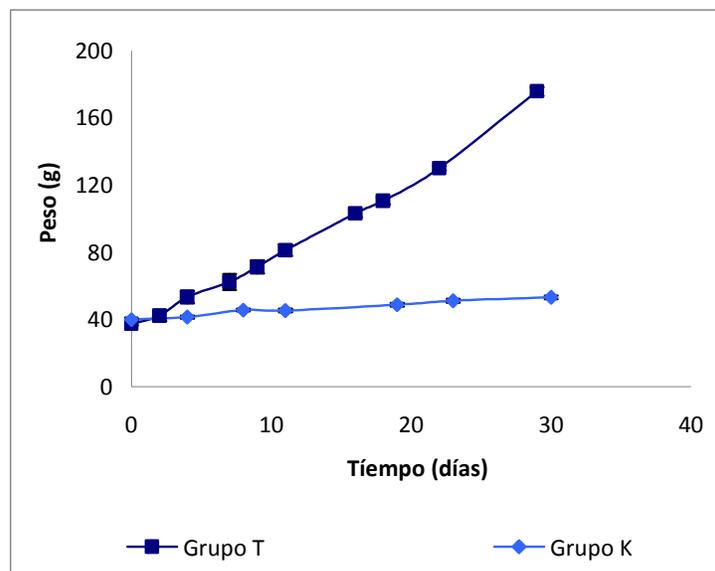


Figura 5. Curva de crecimiento de los grupos testigo (T) y desnutrido (K) durante la fase I

Valores promedio \pm ESM, $n=10$

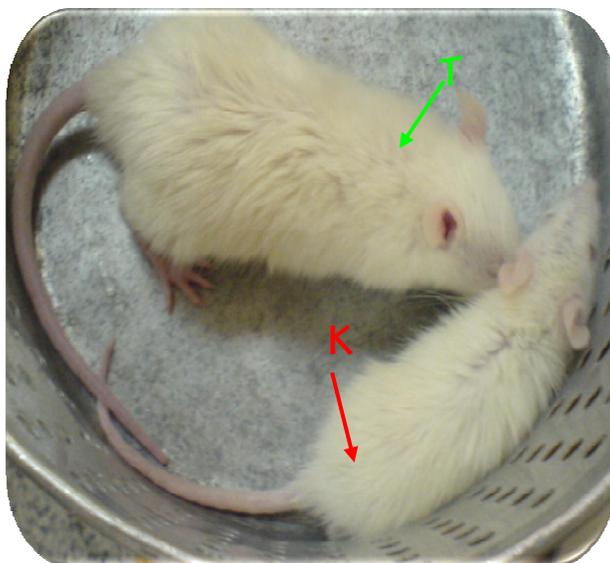


Figura 6. Comparación del aspecto de una rata testigo (T) y una desnutrida (K)

al término de la fase I

Tabla 14. Velocidad de crecimiento (VC) y peso corporal al inicio y al final de la fase I ^{1,2}

	Grupo T	Grupo K
Peso inicial (g)	37.50 ± 1.86	40.00 ± 1.53
Peso final (g)	175.80 ± 5.08	52.18 ± 2.33 ^a
VC (g/día) ³	4.77 ± 0.41	0.401 ± 0.03 ^a

¹ Datos promedio ± DE; n=10

² Superíndices indican diferencia significativa con respecto al grupo testigo ($P < 0.05$)

³ Velocidad de crecimiento = (Peso final - Peso inicial) / 30 días de experimentación.

Los resultados de la Tabla 15 muestran que hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en el consumo de alimento de ambos grupos. El consumo del grupo K correspondió a un 45.2% del consumido por el grupo T. Al parecer el bajo consumo de alimento por los animales es consecuencia de un déficit de aminoácidos indispensables en la dieta. Peng *et al.* (1975), evaluaron el consumo de dietas que diferían en cantidad y composición proteínica: una dieta libre de proteína y una con bajo contenido de aminoácidos indispensables, encontrando que los animales preferían la dieta libre de proteína. Los autores sugirieron que dicha selección podría haber sido el resultado de alteraciones en el patrón de aminoácidos en el plasma y el cerebro, el cual sufre cambios al haber deficiencia de aminoácidos indispensables en la dieta.

Al considerar la cantidad de alimento ingerido, el consumo total de proteína y energía fue significativamente menor para el grupo K. De forma análoga a lo señalado por González-Hernández *et al.* (2008), se calculó el consumo de energía expresado por $\text{kg}_{p.c.}^{0.73}$ (lo cual correspondería a la masa metabólicamente activa), encontrándose diferencia significativa entre los grupos. Igualmente, al calcular el consumo de proteína por $\text{kg}_{p.c.}^{0.73}$ se observa un consumo menor para el grupo K. Estos resultados permitieron demostrar que el cuadro de desnutrición del grupo K es similar a lo propuesto para el kwashiorkor en niños.

Otro parámetro evaluado con respecto al consumo de alimento, es la eficiencia de conversión alimenticia (ECA), el cual es un indicador de que tan adecuado fue el aprovechamiento del alimento por el animal. LA ECA del grupo T fue de 2.61, lo cual indica que se requiere de 2.61 gramos de alimento para que el animal aumente un gramo de peso corporal. Mientras que el grupo K tuvo una ECA de 10.84, es decir, se requiere de 10.84 g de esta dieta para incrementar un gramo de peso corporal, relacionando de esta manera la baja eficiencia de conversión de la dieta utilizada para desarrollar el cuadro de desnutrición.

Tabla 15. Eficiencia de conversión alimenticia (ECA) y consumos de alimento, proteína y energía de los grupos T y K al término de la fase I ^{1,2}

	Grupo T	Grupo K
Alimento consumido (g)	362.10 ± 6.05	132.22 ± 10.63 ^a
Proteína ingerida (g)	54.31 ± 6.05	17.21 ± 1.45 ^a
Proteína ingerida (g/ kg _{p.c.} ^{0.73} ·día)	6.64 ± 0.05	4.95 ± 0.36 ^a
Energía ingerida (MJ)	6.41 ± 0.11	2.32 ± 0.21 ^a
Energía ingerida (kJ/ kg _{p.c.} ^{0.73} ·día)	786.4 ± 4.62	673.64 ± 5.3 ^a
ECA (g alimento/g _{p.c.}) ³	2.61 ± 0.18	10.84 ± 0.82 ^a

¹ Datos promedio ± DE; n=10

² Superíndices indican diferencia significativa con respecto al grupo testigo (P<0.05)

³ ECA= Alimento consumido/(Peso final – Peso inicial)

Para confirmar que se había obtenido un cuadro de desnutrición kwashiorkor se determinó el contenido de proteínas plasmáticas como parámetro bioquímico, ya que una de las diferencias entre este tipo de desnutrición grave y el marasmo es la disminución de proteínas plasmáticas en kwashiorkor (Ávila y Shamah, 2005). En los resultados obtenidos para este indicador se encontraron 17.83 mg/mL y 23.70 mg/mL en el grupo desnutrido y testigo respectivamente. El contenido de proteína plasmática en el grupo testigo se encuentra dentro de los intervalos normales determinados en rata (Sharp, *et al.*, 1998), mientras que en el grupo desnutrido se observó una reducción significativa de proteínas plasmáticas. Debido a que en kwashiorkor la principal deficiencia es la proteína de conversión eficiente y por ende de aminoácidos indispensables como lisina y triptofano, se presenta una menor velocidad en la síntesis de proteínas plasmáticas como un reflejo del ahorro proteínico (Torún y Chew, 1994; Parra y Martínez, 2006). Con base en el contenido de proteína y energía ingerida por el grupo K, así como por el contenido de proteínas plasmáticas se sustenta que los animales bajo estudio presentan desnutrición grave kwashiorkor.

5.1.2. Fase II. Recuperación de los grupos desnutridos y mantenimiento de los grupos testigo.

En la Figura 7 se presenta la curva de crecimiento de los grupos testigo: TA alimentado con 0% de inulina, TC con 2% de inulina y TE con el nivel más alto de inclusión de inulina: 4%. Dado que la dieta base para los tres grupos contiene suficiente cantidad de nutrientes y energía, no se observó diferencia significativa en el crecimiento de los animales. Durante los 90 días de experimentación se observó la misma tendencia de crecimiento entre los grupos, alcanzando el peso de adulto joven (Lloyd, *et al.*, 1982).

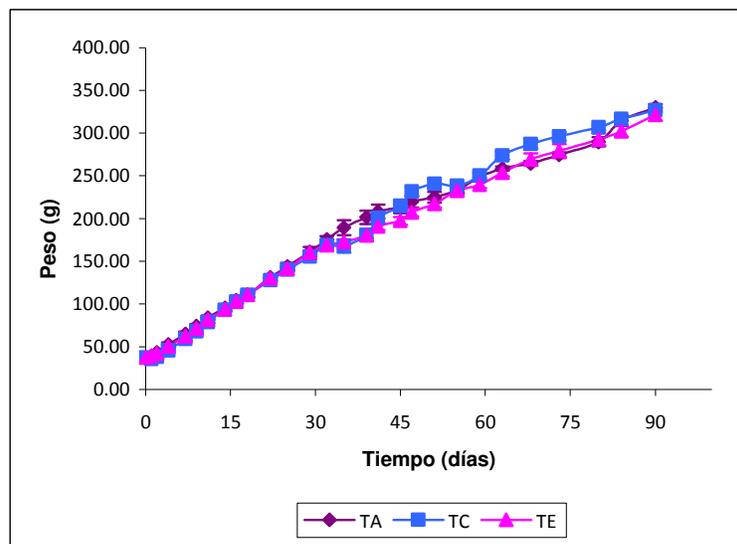


Figura 7. Curva de crecimiento de los grupos testigo. Fase I y II.

TA: 0% de inulina, TC: 2% de inulina y TE: 4% de inulina en la dieta

Valores promedio \pm ESM, n=10

Las curvas de crecimiento de los animales desnutridos y sometidos a la fase de recuperación: KA, KC y KE, alimentados con 0, 2 y 4% de inulina en la dieta, respectivamente, se presentan en la Figura 8. En este gráfico, se observan dos puntos de inflexión en el crecimiento para los tres grupos evaluados. El primer punto de inflexión corresponde al término de la fase de desnutrición e inicio de la fase de recuperación, mientras que el segundo punto corresponde a una disminución en la velocidad de crecimiento después de un mes de recuperación. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el crecimiento de los animales de los tres

tratamientos, básicamente porque éste depende de la calidad de la proteína aportada por la dieta no por el contenido de inulina.

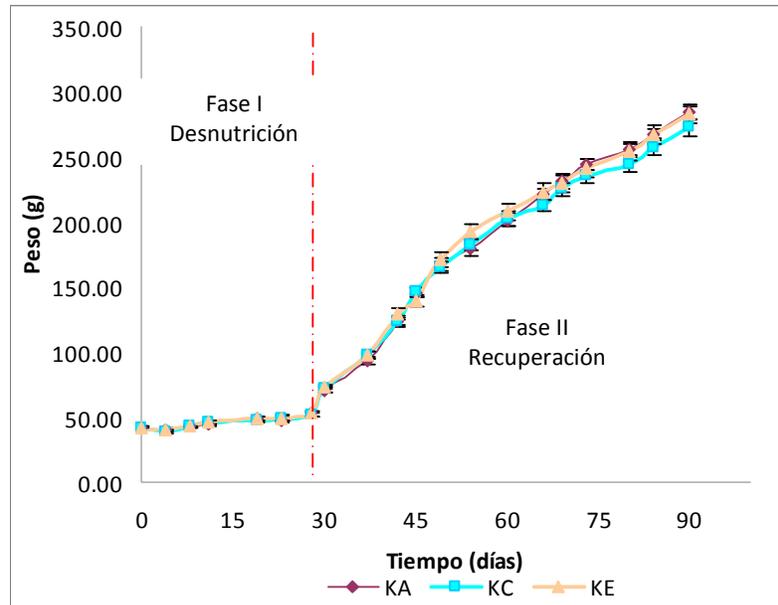


Figura 8. Curva de crecimiento de los grupos desnutridos. Fase I y II.

La línea punteada indica el día en que se inició la fase de recuperación.

KA: 0% de inulina, KC: 2% de inulina y KE: 4% de inulina en la dieta de recuperación

Valores promedio \pm ESM, n=10

Para realizar la comparación entre los grupos testigo y desnutrido sometidos a recuperación, en la Figura 9 se presentan las curvas de crecimiento de todos los tratamientos. Los grupos KA, KC y KE durante la fase de desnutrición alcanzaron la tercera parte del peso promedio de los grupos testigo. Los animales desnutridos presentaron un aumento en su tasa de crecimiento durante la fase de recuperación. A pesar de que la duración de la fase de recuperación fue de dos meses, los animales de los grupos KA, KC y KE no alcanzaron el peso promedio de los grupos testigo. Aunque su tendencia de crecimiento a partir del segundo mes de recuperación es similar.

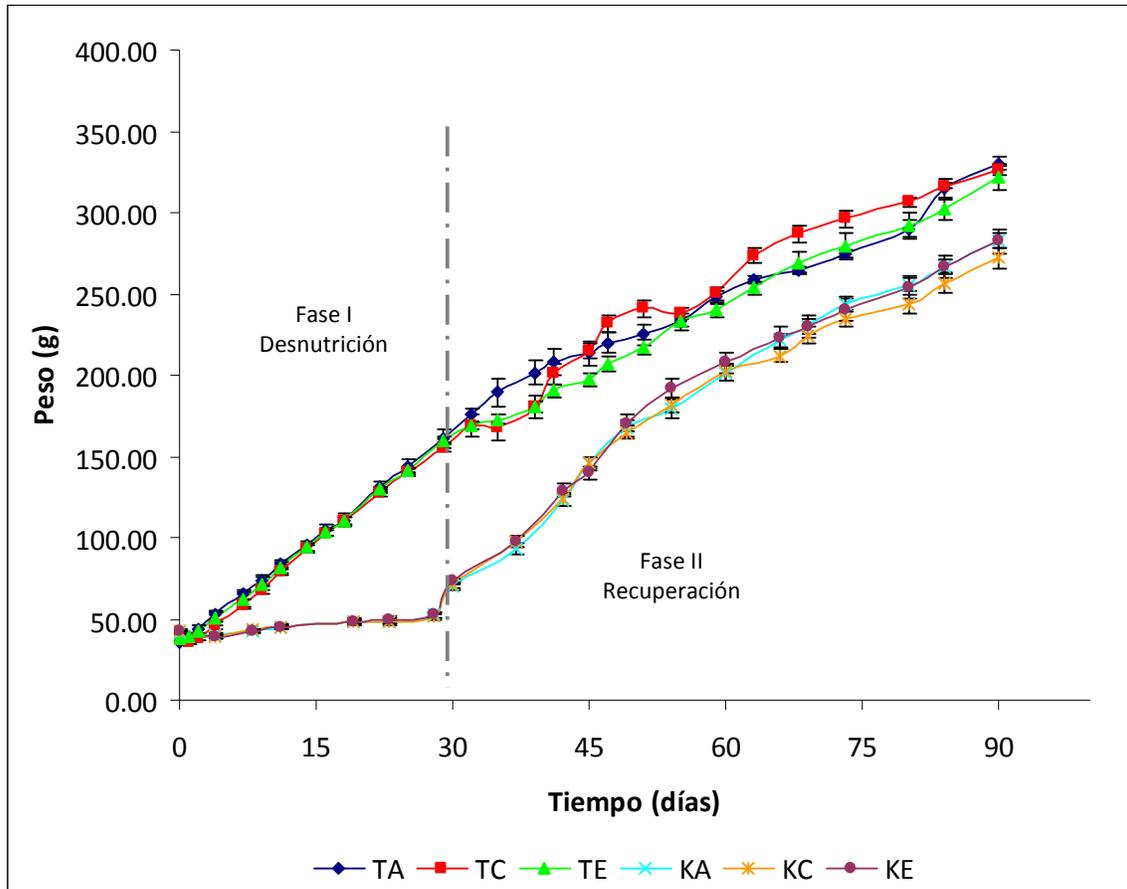


Figura 9. Curva de crecimiento de todos los grupos. Fase I y II.

La línea punteada indica el día en que se inició la fase de recuperación.

TA, KA: 0% de inulina, TC, KC: 2% de inulina y TE, KE: 4% de inulina en la dieta de recuperación

Valores promedio \pm ESM, n=10

En la Tabla 16 se muestran los valores del peso final de los tres grupos testigo, confirmándose que no hay diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellos. Además se presenta la velocidad de crecimiento cada 30 días de estudio, observándose diferencia entre los grupos TA y TE con respecto al grupo TC. Debido a que esta diferencia sólo se observó al tiempo 60, posiblemente se deba a un error experimental durante el monitoreo de los animales, ya que para el tiempo 90, la velocidad de crecimiento de los tres grupos se igualan. A lo largo del estudio, se observa una desaceleración en el crecimiento de los animales conforme éstos se van acercando al peso de adultos.

Además se compilan los pesos iniciales y finales a 30, 60 y 90 días de experimentación de los grupos desnutridos KA, KC y KE. En ella se puede observar que la velocidad de crecimiento de los animales desnutridos sufrió un aumento considerable en el primer mes de recuperación (VC_{60}) debido al cambio de una proteína de baja eficiencia de conversión por una de alta eficiencia de conversión. Al término del segundo mes de recuperación, la velocidad de crecimiento (VC_{90}) disminuyó con respecto al primero, posiblemente a que los animales ya lograron satisfacer sus necesidades inmediatas de proteína y energía para su crecimiento y desarrollo. En relación al efecto de la proporción de inulina en la dieta sobre el crecimiento, no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los grupos KA, KC y KE. Sin embargo, se observa una tendencia de reducción de la VC_{90} conforme aumenta el contenido de inulina en la dieta; posiblemente dicha tendencia podría ser evaluada si el estudio se continuara por más tiempo.

Al comparar los resultados entre todos los tratamientos se observó que durante la fase de desnutrición los animales alcanzaron 30% del peso de los grupos testigo, con una velocidad de crecimiento 13 veces menor. Después de un mes de recuperación, los grupos KA, KC y KE alcanzaron un 80% del peso promedio de los grupos testigo. Sin embargo, la velocidad de crecimiento (VC_{60}) fue menor en los grupos testigo (TA, TC y TE), esto debido a que dichos grupos continúan con su desarrollo normal pues no han sido sometidos a cambios en su alimentación en cuanto a aporte de nutrimentos y energía, mientras que los animales desnutridos tienen una tasa de crecimiento alta para recuperar peso corporal.

En este punto, no se observa diferencia significativa entre los grupos alimentados con los diferentes niveles de inclusión de inulina en la ganancia de peso corporal promedio. Aunque ya se establece diferencia significativa ($P < 0.05$) en VC_{60} del grupo TE con respecto al resto de los grupos, lo cual está relacionado con el consumo de inulina aportada por la dieta que se menciona en la página 56.

Al segundo mes de recuperación, se mantiene la diferencia en el peso entre los grupos testigo y los que sufrieron desnutrición, lo cual sugiere que en estos dos meses se logra su recuperación parcial. La velocidad de crecimiento de los grupos KA, KC y KE disminuye en un 45% entre el primer y segundo mes, ya que los animales han cubierto sus demandas inminentes de proteína y energía. Los grupos testigo siguen manteniendo su velocidad de crecimiento, pues aún no alcanzan el peso promedio de adultos (Lloyd, *et al.*, 1982).

Tabla 16. Velocidad de crecimiento y peso corporal al inicio y al final de todos los tratamientos correspondientes a la fase I y II ^{1,2}

TESTIGOS								
Grupo	% de inulina	Peso inicial (g)	Peso final ₃₀ (g)	VC ₃₀ (g/día) ³	Peso final ₆₀ (g)	Peso final ₉₀ (g)	VC ₆₀ (g/día) ³	VC ₉₀ (g/día) ³
TA	0	36.50 ± 2.80	160.98 ± 11.02	4.30 ± 0.40	248.48 ± 7.36	330.0 ± 8.04	2.92 ± 0.26	2.71 ± 0.21
TC	2	37.54 ± 1.96	155.58 ± 6.58	4.08 ± 0.23	250.1 ± 8.56	322.25 ± 6.99	3.15 ± 0.14 ^a	2.42 ± 0.17
TE	4	37.50 ± 1.86	160.08 ± 5.08	4.40 ± 0.42	239.68 ± 8.34	321.50 ± 14.8	2.65 ± 0.25	2.72 ± 0.16
DESNUTRIDOS Y RECUPERADOS								
Fase de Desnutrición (I)					Fase de Recuperación (II)			
		Peso inicial (g)	Peso final ₃₀ (g)	VC ₃₀ (g/día) ³	Peso final ₆₀ (g)	Peso final ₉₀ (g)	VC ₆₀ (g/día) ³	VC ₉₀ (g/día) ³
KA	0	41.64 ± 3.25	52.40 ± 6.86 ^a	0.34 ± 0.18 ^a	201.34 ± 15.83 ^a	283.31 ± 15.30 ^a	4.96 ± 0.30 ^b	2.73 ± 0.18
KC	2	42.01 ± 2.88	51.53 ± 5.10 ^a	0.32 ± 0.18 ^a	191.64 ± 17.20 ^a	272.04 ± 21.18 ^a	4.68 ± 0.42 ^b	2.68 ± 0.22
KE	4	42.13 ± 2.60	52.38 ± 6.18 ^a	0.34 ± 0.20 ^a	207.88 ± 20.07 ^a	282.44 ± 24.19 ^a	5.18 ± 0.42 ^b	2.50 ± 0.24

¹Datos promedio ± DE; n=10. El subíndice señala el día al que se determinó el parámetro

² Superíndices indican diferencia significativa con respecto al grupo testigo (TA); literales distintas denotan diferencia significativa entre grupos (P<0.05)

³ Velocidad de crecimiento= (Peso final - Peso inicial)/número de días. El parámetro se determinó cada 30 días.

Los resultados de ECA y consumo de alimento para todos los grupos se presentan en la Tabla 17. De manera semejante a los resultados de crecimiento durante la fase de desnutrición, el consumo de alimento y la ECA al día 30 son significativamente menores en los grupos desnutridos. Una vez que se inicia el proceso de recuperación, hay un aumento significativo en el consumo de alimento en los grupos K. Lo anterior está relacionado con la alta eficiencia de conversión de la proteína en las dietas empleadas durante la fase II, ya que los animales tienden a consumir mayor cantidad de alimento si éste es de buena calidad nutricional (Peng, 1975).

En relación a la ECA₆₀ de los grupos testigo, se observó diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los grupos TA y TC con respecto al grupo TE, lo cual sugiere una influencia de la presencia de inulina en el aprovechamiento de la dieta administrada. Roberfroid (2000) señaló que el consumo de inulina provoca un efecto de saciedad y por lo tanto una disminución en el consumo de alimento se vería reflejado en el incremento de la ECA₆₀. En el caso de los grupos desnutridos en recuperación, el grupo KE con mayor inclusión de inulina en la dieta presentó un menor consumo de alimento con respecto a los otros dos grupos. Lo que sugiere que los animales del grupo KE tuvieron un mejor aprovechamiento del alimento, pues incrementaron de peso a la par que los grupos KA y KC con un menor consumo de dieta.

Al término de los 90 días de estudio, aunque los animales en recuperación consumieron mayor cantidad de alimento que los grupos testigo no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la ECA₉₀ entre ellos, excepto por el grupo KA que presentó el valor más bajo. El grupo KE que había presentado una ECA₆₀ baja, en el segundo mes de recuperación igualó el valor de ECA de los grupos testigo. Posiblemente, el mayor consumo de alimento con respecto al mes anterior se debió a que la cantidad de inulina en la dieta no fue ajustada por el peso de los animales y por lo tanto el menor consumo del prebiótico disminuyó el efecto de saciedad a este tiempo.

Tabla 17. Eficiencia de conversión alimenticia (ECA) y consumos de alimento, proteína y energía para todos los tratamientos correspondientes a la fase I y II.^{1,2}

TESTIGOS							
Grupo	% de inulina	Alimento consumido ₃₀ (g)	ECA ₃₀ (g alimento/g _{p.c.})	Alimento consumido ₆₀ (g)	ECA ₆₀ (g alimento/g _{p.c.})	Alimento consumido ₉₀ (g)	ECA ₉₀ (g alimento/g _{p.c.})
TA	0	364.65 ± 16.16	2.92 ± 0.21	260.25 ± 15.99	2.97 ± 0.23	638.10 ± 25.68	3.78 ± 0.17
TC	2	358.76 ± 10.99	3.03 ± 0.18	265.80 ± 16.45	2.71 ± 0.18	627.14 ± 23.20	3.76 ± 0.23
TE	4	344.08 ± 6.05	2.81 ± 0.17	246.05 ± 15.64	3.19 ± 0.17 ^b	619.95 ± 18.37	3.84 ± 0.15
RECUPERADOS							
Fase de Desnutrición (I)				Fase de Recuperación (II)			
		Alimento consumido (g)	ECA ₃₀ (g alimento/g _{p.c.})	Alimento consumido ₆₀ (g)	ECA ₆₀ (g alimento/g _{p.c.})	Alimento consumido ₉₀ (g)	ECA ₉₀ (g alimento/g _{p.c.})
KA	0	139.58 ± 11.06 ^a	12.97 ± 1.03 ^a	464.41 ± 30.93 ^b	3.12 ± 0.23	778.42 ± 58.20 ^a	3.37 ± 0.13 ^a
KC	2	138.61 ± 20.02 ^a	14.56 ± 1.21 ^a	417.53 ± 33.56 ^b	2.98 ± 0.22	787.64 ± 42.10 ^a	3.57 ± 0.28
KE	4	135.31 ± 16.53 ^a	13.2 ± 1.07 ^a	360.26 ± 23.18 ^a	2.31 ± 0.16 ^a	819.05 ± 65.82 ^a	3.56 ± 0.11

¹ Datos promedio ± DE; n=10. El subíndice señala el día al que se determinó el parámetro.

² Superíndices indican diferencia significativa con respecto al grupo testigo (TA); literales distintas denotan diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$)

³ ECA= Alimento consumido/(Peso final- Peso inicial); g de alimento/g de peso corporal; calculada para cada mes.

En la Tabla 18 se muestra el consumo de inulina por los diferentes tratamientos a lo largo de la fase II. En el primer mes de recuperación los grupos KC y KE mostraron mayor ingesta de inulina que sus respectivos grupos testigo: TC y TE, a causa del mayor consumo de alimento. Al término de la fase II se mantuvo dicha tendencia incluso, se encontró que el consumo de inulina por los grupos desnutridos es 1.4 veces mayor que el de los grupos testigo ($P>0.05$).

No obstante que algunos autores como Azorín-Ortuño, *et al.*, (2009) sugieren ajustar el contenido de inulina en dietas con respecto al peso corporal de los animales, en el presente trabajo se estableció que los porcentajes de inclusión de inulina se mantuvieran constantes en la elaboración de las dietas. Lo anterior se determinó al considerar que al extrapolarse en el tratamiento de niños desnutridos se dificultaría el ajuste de la cantidad de prebiótico a adicionar diariamente en las fórmulas o alimentos utilizados para su recuperación.

Tabla 18. Consumo de inulina por los distintos tratamientos durante la fase II. ^{1,2}

Grupo	% inulina en la dieta	Inulina ingerida ₆₀ (g)	Inulina ingerida ₉₀ (g)
TA	0	-	-
TC	2	5.32 ± 0.39	13.66 ± 0.96
TE	4	9.84 ± 0.61	28.20 ± 0.45
KA	0	-	-
KC	2	6.99 ± 1.34 ^a	18.69 ± 1.53 ^a
KE	4	14.41 ± 0.93 ^a	38.92 ± 2.64 ^a

¹ Datos promedio ± DE; n=10. El subíndice indica el día al que se determinó cada parámetro.

² Superíndices indican diferencia significativa con el respectivo grupo testigo ($P<0.05$)

5.2. Ensayo microbiológico.

La selección de los grupos microbianos empleados en el presente estudio se basó en lo propuesto por algunos autores como Gibson, *et al.* (2004) y Azorín-Ortuño *et al.* (2009), quienes señalan que dichos grupos son representativos de la microbiota saludable y deben ser monitoreados para evaluar el efecto benéfico de prebióticos como la inulina.

En la Tabla 19 se muestran los resultados del análisis microbiológico de las heces del grupo T y K. Como era de esperarse, el grado de desnutrición disminuyó significativamente ($P < 0.05$) la carga microbiana de tres de los grupos de microorganismos evaluados. Las bifidobacterias y lactobacilos fueron los más afectados por el cuadro de desnutrición. Dichos resultados concuerdan con lo obtenido por Dock, *et al.* (2004), quienes provocaron el cuadro de desnutrición con una dieta con 0.5% de proteína por 15 días.

En el caso de las enterobacterias no se presentaron diferencias significativas entre los grupos ($P > 0.05$). Además fue la familia que presentó mayor variación en las determinaciones, pues en algunos casos no se detectaron en las diluciones más bajas. Es probable que su presencia en heces varía en cuanto a frecuencia y por lo tanto al momento de realizar el análisis microbiológico no se detectaran en todos los animales (Klessen, *et al.*, 1997).

Tabla 19. Cuenta microbiana en heces de los grupos T y K al final de la fase I. ^{1,2}

	Grupo T	Grupo K
Bifidobacterias (log NMP/g)	9.23 ± 0.01	7.71 ± 0.69 ^a
Lactobacilos (log UFC/g)	9.76 ± 0.21	8.55 ± 0.29 ^a
Enterobacterias (log UFC/g)	4.84 ± 0.34	4.39 ± 0.54
Anaerobios totales (log UFC/g)	10.69 ± 0.31	9.62 ± 0.31 ^a

¹ Datos promedio ± DE; n=9.

² Superíndices indican diferencia significativa con respecto al grupo testigo ($P < 0.05$)

Los resultados de la fase II se presentan en la Tabla 20. La cuenta de anaerobios totales se recuperó tras la disminución observada en la fase de desnutrición. Sin embargo, no se presentaron cambios significativos ($P > 0.05$) entre los tratamientos de manera similar con lo reportado por

Campbell, *et al.* (1997), posiblemente a que en el presente trabajo se manejaron dosis bajas de inulina en las dietas. Aunado a lo anterior, al ser la cuenta total de anaerobios, es factible que al existir una diversidad de géneros anaerobios en las heces, unos hayan aumentado y otros disminuido por efecto del prebiótico, por lo que en la carga total de anaerobios no se encontró diferencia.

En lo que respecta a la carga de lactobacilos, en los grupos testigo aumentó conforme la proporción de inulina aumentaba en la dieta encontrándose diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el grupo TE y los grupos TA y TC. Dicho resultado difiere de lo reportado por Campbell, *et al.* (1997), quienes monitorearon la carga de lactobacilos en ratas alimentados con bajos niveles de prebióticos, manteniéndose ésta sin cambio. Sin embargo, en dicho trabajo la alimentación con prebióticos se mantuvo sólo catorce días, mientras que en el presente trabajo el consumo de inulina se mantuvo por 60 días.

Los grupos desnutridos no presentaron diferencia significativa ($P > 0.05$) a pesar de que se observó una mejoría en la carga con respecto al valor obtenido durante el periodo de desnutrición, y los valores de esta fase son similares a los del grupo TA. Lesniewska, *et al.*, en 2006 reportó que la microbiota intestinal en la rata no sólo puede verse modificada por la dieta, sino que incluso es dependiente de la edad de los animales, por lo que es factible que la recuperación en la carga de lactobacilos se deba principalmente a la edad de los animales al finalizar la fase II.

Los cambios más evidentes en la flora microbiana están relacionados con las bifidobacterias, pues son el grupo de microorganismos que se ve más beneficiado por la presencia de prebióticos (Olano-Martin, *et al.*, 2000) y específicamente, de inulina pues tienen una ventaja nutricional sobre la microbiota que no puede aprovecharla (Roberfroid, 2005). Se observa que la cuenta de este género fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en el grupo TE alimentado con 4% de inulina con respecto a los demás grupos. Lo anterior, confirma que niveles bajos de FOS permiten su desarrollo, ya que cuentan con actividad de β -1,2 glucosidasa, permitiendo la fermentación de inulina (Van de Wiele, *et al.*, 2004). Sin embargo, niveles menores al 4% de inclusión no tienen un efecto benéfico en la flora microbiana.

En el caso de los grupos desnutridos, se logró la recuperación de la flora microbiana estudiada con respecto a lo cuantificado en la fase I mostrando mayor recuperación conforme el incremento de inulina en la dieta. Cabe destacar que para el grupo KE se observó un aumento de dos órdenes de

magnitud (considerando UFC/g) después de los 60 días de alimentación con 4 % de inulina, aunque comparado con el grupo TA no se observó diferencia significativa ($P>0.05$). Posiblemente se hubieran encontrado mejores resultados si al término del primer mes de recuperación se ajustara el nivel de inclusión en la dieta considerando que el peso de los animales de los grupos K estaba alrededor de los 200g. Incluso, el continuar con el estudio por un mes más para evaluar si se lograba mayor recuperación tanto del estado nutricional como de la microbiota.

Tabla 20. Cuenta microbiana en heces de todos los grupos evaluados al final de la fase II.^{1,2}

	Anaerobios totales	Enterobacterias	Lactobacilos	Bifidobacterias
	(log UFC/g)			(log NMP/g)
TA	10.12 ± 0.24	3.78 ± 0.40	9.96 ± 0.37	9.26 ± 0.21
TC	10.07 ± 0.14	4.11 ± 0.38	10.28 ± 0.46 ^a	9.01 ± 0.19 ^a
TE	10.54 ± 0.18	4.94 ± 0.23	11.38 ± 0.09 ^b	10.87 ± 0.26 ^b
KA	10.08 ± 0.37	4.16 ± 0.33	9.28 ± 0.37	8.47 ± 0.31 ^a
KC	10.01 ± 0.43	4.63 ± 0.43	9.40 ± 0.62	8.83 ± 0.63 ^a
KE	10.08 ± 0.37	4.51 ± 0.63	9.10 ± 0.33	9.24 ± 0.29

¹ Datos promedio ± DE; n=9.

² Superíndices indican diferencia significativa con respecto al grupo testigo (TA); literales distintas denotan diferencia significativa entre grupos ($P<0.05$)

Otro aspecto que influye en los resultados microbiológicos es el grado de polimerización del fructo-oligosacárido, que depende de la fuente de la cual fue extraído. Pellikan, *et al.* (2007), estudiaron la velocidad de fermentación de oligofructosa, inulina de achicoria y mezcla de ambas, encontrando una correlación de la velocidad de fermentación con el grado de polimerización. En el caso de la inulina de achicoria es fermentada con una velocidad intermedia, ya que tiene un grado de polimerización promedio de 10-12 y por lo tanto, puede ser aprovechada por la microbiota de manera adecuada.

Lynch, *et al.* (2009), encontraron una interacción entre el contenido de proteína y la presencia de inulina sobre la cuenta de *Escherichia coli* en heces de cerdos. Los animales alimentados con la dieta

suplementada con inulina y con mayor contenido de proteína (20%), mostraron una disminución en la población de *E. coli* comparados con el grupo alimentado con la dieta suplementada con inulina y de bajo contenido proteínico (14%). Dado que los grupos alimentados con inulina tienen una mayor población de bifidobacterias, se considera que éstas secretan una bacteriocina que inhibe la proliferación de *E. coli*, lo cual puede explicar su disminución en heces y apoyar el uso de prebióticos y probióticos en el tratamiento de cuadros de infección en individuos desnutridos.

Recientemente, Kerac, et al. (2009) evaluaron el efecto de simbióticos administrados en un alimento listo para su consumo (Synbiotic2000) tanto en el tratamiento hospitalario como ambulatorio de 399 niños con desnutrición grave, sin encontrar mejoras significativas en las valoraciones nutricionales y clínicas. En dicho estudio, la formulación contenía la base de los alimentos listos para consumo indicada por la OMS, cuatro diferentes bacterias lácticas: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Leuconostoc mesenteroides*; junto con cuatro fibras (2.5g de c/u): β -glucanos, inulina, pectina y almidón resistente. En el caso de los niños que fueron hospitalizados se observó un aumento de diarrea severa, relacionada a la gravedad con la que ingresaron, a la posibilidad de adquirir una infección hospitalaria y al tratamiento con antibióticos que recibieron, e incluso, los autores señalan que dos de los cuatro probióticos utilizados en pruebas *in vitro* presentaron sensibilidad al antibiótico utilizado. La diversidad de prebióticos empleados en dicho estudio posiblemente causaron el crecimiento de microbiota inespecífica y por lo tanto la reducción de la efectividad de los prebióticos. Lo anterior sin embargo, no se comprobó pues no se realizaron análisis de la microbiota en heces.

A pesar de dichos resultados desalentadores del manejo de simbióticos para el tratamiento de niños desnutridos, el presente trabajo confirma que la inulina es un buen prebiótico que puede ser utilizado como adyuvante en los cuadros de desnutrición. No obstante, que se evaluó sólo algunos grupos de microorganismos asociados con la microbiota benéfica, el presente estudio da pauta para continuar otras investigaciones relacionadas con la respuesta inmunológica y con ello confirmar su uso en el tratamiento de ciclos de desnutrición-infección.

6. CONCLUSIONES.

- ❖ *Se logró desarrollar un cuadro de desnutrición grave tipo kwashiorkor en ratas mediante el uso de una dieta con 13% de una mezcla de proteínas de baja eficiencia de conversión. La concentración de proteína plasmática en el grupo desnutrido fue significativamente menor con respecto al grupo testigo, confirmando el grado de desnutrición buscado.*
- ❖ *El grado de desnutrición produjo una disminución significativa en la carga de bifidobacterias, lactobacilos y anaerobios totales en heces.*
- ❖ *La dieta con 2% de inulina empleada en la recuperación de animales desnutridos no generó cambios significativos en la carga microbiana en heces con respecto al grupo testigo.*
- ❖ *La dieta con 4% de inulina favoreció la recuperación de la microbiota en heces, principalmente de bifidobacterias y lactobacilos.*
- ❖ *En relación a los anaerobios totales no se encontró diferencia significativa entre ninguno de los grupos desnutridos recuperados y los testigo.*
- ❖ *Finalmente, el consumo de la dieta con 4% de inulina por 60 días favoreció la recuperación de microbiota benéfica en animales previamente desnutridos.*

7. PERSPECTIVAS.

Los resultados del presente trabajo demuestran un efecto benéfico en la carga de bifidobacterias y lactobacilos en animales desnutridos sometidos a recuperación con una dieta al 4 % de inulina. Esto es sólo la base para continuar con el estudio de otros efectos benéficos asociados a la inulina para su evaluación en la recuperación de animales desnutridos, como lo son la absorción de calcio y mejora del sistema inmunológico. Incluso en presencia de antibióticos, para establecer los niveles de inulina en los que se mantiene su efecto benéfico.

Los grupos de microorganismos que se vieron favorecidos por la inclusión de inulina en la dieta deben ser estudiados exhaustivamente para una mejor comprensión de sus funciones metabólicas y de protección dentro del tracto gastrointestinal. Al mismo tiempo se deben estudiar más exhaustivamente los grupos de microorganismos que se vieron incrementados por el uso de inulina, para su posible uso como prebiótico.

REFERENCIAS.

- ❖ Almeida, S., De Araujo, M., (2001). Postnatal protein malnutrition affects play behavior and other social interactions in juvenile rats, *Physiology and Behavior*. 14: 45-51.
- ❖ Ashworth A., Khanum S., Jackson A., Schofield C., (2004). Directrices para el tratamiento hospitalario de los niños con malnutrición grave. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, pp. 9-21.
- ❖ Ávila, A., Shamah, L., (2005). Diagnóstico de la magnitud de la desnutrición infantil en México. En: *México, ante los desafíos de desarrollo del milenio. Serie Metas del Milenio*. Consejo Nacional de la Población, México, pp. 99-105.
- ❖ Azorín-Ortuño, M., Urbán, C., Cerón, J., Tecles, F., Allende, A., (2009). Effect of low inulin doses with different polymerisation degree on lipid metabolism, mineral absorption, and intestinal microbiota in rats with fat supplemented diet. *Food Chemistry*. 113:1058 - 1065.
- ❖ Bergmeyer, H., (1996). The Lowry Method en: *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, J., Grassi, M., (Eds), 3° Ed., Weinheim, Vol. 1, pp. 88-91.
- ❖ Berti, A., Rino, E., Manenti, F., Pizzi, C., (2008). Outcome of severely malnourished children treated according to UNICEF 2004 guidelines: a one year experience in a zone hospital in rural Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102: 939-944.
- ❖ Campbell, J., Fahey, G., Wolf, B., (1997) Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *The Journal of Nutrition*. 127:130-136.

-
- ❖ Carabin, I., Flamm, G., (1999). Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 30: 268-282.
 - ❖ Chandra, R., (1983). Nutrition, immunity, and infection: present knowledge and future directions. *The Lancet*. 26: 688-691.
 - ❖ Chávez, A., Ávila, A., *Reloj de la desnutrición infantil, 2009*. (en línea). <http://www.nutricionemexico.org.mx/> Órgano responsable: Sociedad Latinoamericana de Nutrición. México. Consultada: 11/05/09.
 - ❖ Collins, S., Dent, N., Binns, P., Bahwere, P., Sadler, K., Hallam, A., (2006). Management of severe acute malnutrition in children. *Centre for International Child Health*. 368:1992-2000.
 - ❖ Cuevas, L., Rivera, A., Shamah, T., González, T., Macías, M., Ávila, M., (2007). Estado nutricional. En: *Resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006*. Shamah, T., Villalpando, S., Rivera, J., (Eds). Instituto Nacional de Salud Pública, México.
 - ❖ Cummings, J., (1997). *The Large Intestine in Nutrition and Disease*. Institut Danone. Bélgica, pp.5-13.
 - ❖ Dirección General de Estadística, Secretaría de Salud, (2000). Principales resultados de la estadística sobre la mortalidad en México, 1998. *Salud Pública de México* 42(2) marzo-abril: 155- 161.
 - ❖ Dock, D., Aguilar, J., Latorraca, M., (2004). Probiotics enhance the recovery of gut atrophy in experimental malnutrition. *Biocell*. 28(2):143 – 150.
 - ❖ FAO Technical Meeting Report, (2007). Food Quality and Standards Service. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp.4-9.

-
- ❖ Gibson, G, Probert, H., Van Loo, J., Rastall, A., Roberfroid, M., (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17, 259-275.
 - ❖ González-Hernández, I., Jung, H., Sotelo, A., (2008). Effect of malnutrition on the pharmacokinetics of cefuroxime axetil in young rats. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 11, 9-21.
 - ❖ Granato, P., (2006). Microbial flora of humans and microbial virulence factors. In: *Biological Safety Principles Practices*, Fleming D., Hont D., (Eds), Editorial ASM Press, 4° Edition, Washington D.C., pp. 3-17.
 - ❖ Grasten, S., Liukkonen, K., Chervatidis, A., El-Nezami, H., Poutanen, K., Mykkanen, H.. (2003). Effects of wheat pentosan and inulin on the metabolic activity of fecal microbiota and bowel function in healthy humans. *Nutrition Research*. 23:1503 – 1514.
 - ❖ Haller, M., Müller, W., Alomed, L., Binder, H., Esterberger, W., Arnold, P., (1998). Single-injection inulin clearance – a simple method for measuring glomerular filtration rate in dogs. *Research in Veterinary Science*. 64:131-136.
 - ❖ Jenkins, D., Cryril, W., Vuksan K., (1999). Inulin, oligofructose and intestinal function. *The Journal of Nutrition*. 129: 1431S – 433S.
 - ❖ Kaur, N., Gupta, A., (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*. 27(7): 703-714.
 - ❖ Kerac, M., Bunn, J., Seal, A., Thindwa, M., Tomkins, A., Sadler, K., Bahwere, P., Collins, S. (2009). Probiotics and prebiotics for severe acute malnutrition (PRONUT study): a double-blind efficacy randomized controlled trial in Malawi. *The Lancet*, 374:136-144.

-
- ❖ Klessen B, Sykura, B., Zunft, H., 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: 1397-1902.
 - ❖ Kuzmuk, K., Swanson, K., Tappenden, K., Schook, L., (2005). Diet and age affect intestinal morphology and large bowel fermentative end-product concentrations in senior and young adult dogs. *The Journal of Nutrition*. 135: 1940 – 1945.
 - ❖ Lagrutta, F., (1995). Tratamiento nutricional de la desnutrición. En: *Nutrición*, Arnarz, O., Gamboa, J., Escobar, E., Aparicio, E., (Eds), Editorial Interamericana, México, pp.121-133.
 - ❖ Lesniewska, V., Rowland, I., Cani, P., Neyrinck, A., Delzenne, N., Naughton, P., (2006). Effect on components of the intestinal microflora and plasma neuropeptide levels of feeding *Lactobacillus delbrueckii*, *Bifidobacterium lactis*, and inulin to adult and elderly rats. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 6533-6538.
 - ❖ Lloyd, L., McDonald, B., Crampton, E, (1982) *Fundamentos de nutrición*. Editorial Acribia, Madrid, Capítulo 22 y 26.
 - ❖ Lingyun, W., Jianhua, W., Xiadong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C., Tianhua, F., Fan, Z., (2007). Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Journal of Food Engineering*. 79: 1087-1093.
 - ❖ Lynch, B., Callan, J., O'Doherty, J., (2009). The interaction between dietary crude protein and fermentable carbohydrate source on piglet post weaning performance, diet digestibility and selected faecal microbial populations and volatile fatty acid concentration. *Livestock Science*. (en prensa).

-
- ❖ Madrigal, L., Sangronis, E., (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57: 387-396.
 - ❖ Meijer, W., Mathijssen, W., (1993). Experimental and simulated production of inulin by chicory and Jerusalem artichoke. *Industrial Crops and Products*. 1:175-183.
 - ❖ Mussatto, S., Mancilla, I., (2007). Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*. 68: 587-597.
 - ❖ Niness, K., (1999). Inulin and oligofructose: What are they? *The Journal of Nutrition*. 129: 1402S – 1406S.
 - ❖ Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobia en placa. Secretaria de Salud. Estados Unidos Mexicanos.
 - ❖ Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Determinación de bacterias Coniformes. Técnica del Número Más Probable. Secretaría de Salud. Estados Unidos Mexicanos.
 - ❖ Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, Para la atención a la salud del niño. Secretaría de Salud. Estados Unidos Mexicanos.
 - ❖ Olano – Martin, E., Mountzouris, K., Gibson, G., Rastall, R., (2000). *In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition*. 83: 247 – 255.
 - ❖ Parra, M., Martínez, J., (2006). Evaluación analítica. En: *Nutrición básica humana*, Soriano, J., (Ed), Universidad de Valencia, Valencia, pp.348-350.

-
- ❖ Peng, Y., Meliza, L., Vavich, M., Kemmerer, A., (1975). Effects of amino acid imbalance and protein content of diets of food intake and preference of young adult, and diabetic rats. *Journal of Nutrition*. 48:25-36.
 - ❖ Pellikaan, W., Verdonk, J., Shim, S., Verstegen, M., (2007). Adaptative capacity of faecal microbiota from piglets receiving diets with different types of inulin-type fructans. *Livestock Science*. 108:178 – 181.
 - ❖ Quigley, E., Quera, R., (2006). Small intestinal bacterial overgrowth: Roles of antibiotics, prebiotics, and probiotics. *Alimentary Pharmabiotic Centre*. 130: 578-590.
 - ❖ Rastall, R., Gibson, G., Gill, H., Guarner, F., Klaenhammer, T., Pot, B., Reid, G., Rowland, I., Sanders, M., (2005). Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology*. 52: 145-152.
 - ❖ Reid, G., (2008). Probiotics and prebiotics- Progress and challenges. *International Dairy Journal*. 18: 969-975.
 - ❖ Rinne, M., Gueimonde, M., Kalliomäki, M., Hoppu, U., Salminen, S., Isolauri, E., (2005). Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 43: 59-65.
 - ❖ Roberfroid, M., (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71(suppl):1682S-1687S
 - ❖ Roberfroid, M., (2005). Inulin-type fructans. Functional food ingredients. CRC Press, Florida, Capítulo 3 y 5.

-
- ❖ Rossi, T., Lee, P., Young, C., Lerner, A., Lebendenthal, E., (1986). Effect of nutritional rehabilitation on the development of intestinal brush border disaccharidases of postnatally malnourished weanling rats. *Pediatric Research*. 20: 793-797.
 - ❖ Sharp, P., La Regina, M., (1998). *The laboratory rat*. Suckow, M., (Ed), CRC Press, Florida, pp. 16, 35-44.
 - ❖ Saulnier, D., Spinler, J., Gibson, G., Versalovic, J., (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 20: 1-7.
 - ❖ Tannock, G., (2002). Probiotics and prebiotics: Where are we going? En: Probiotics and prebiotics: Where are we going?, Tannock, G., (Ed), Caister Academic Press, Norfolk, pp. 1-38.
 - ❖ Torún, B., Chew, F. (1994). Protein-energy malnutrition. In: Modern Nutrition in Health and Disease, Shils, M., Olson, J., Shike, M., (Eds), Philadelphia, Vol. 2, pp 950-976.
 - ❖ Touissant G., García-Aranda, J., (2001). Desnutrición Energético Proteínica. En: *Nutriología Médica*, Casanueva E, Kaufer-Horwitz, M., (Eds), Editorial Médica Panamericana, México, D.F., 2°. Edición, pp. 22-31, 212-245.
 - ❖ Van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H., Verstraete, W., (2004). Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*. 51: 143-153.
 - ❖ Van Loo, J., Coussement, P., DeLeenheer, L., Hoebregs, H., Smith, G., (1995). On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet. *CRC Critical Review in Food Science and Nutrition*. 35: 525-552.

- ❖ World Health Organization, World Food Programme, United Nations System Standing Committee on Nutrition, United Nations Children's Fund (2007). *Community-Based management of severe acute malnutrition*, World Health Organization, Geneva, pp. 2-6.

Anexo A. Crecimiento en placa y en tubo de los grupos de microorganismos estudiados.



Figura 10. Réplica de crecimiento en placa de enterobacterias.
(Agar Mc Conkey, 37°C, 48h)
Muestra; Rata 3, grupo T, fase I

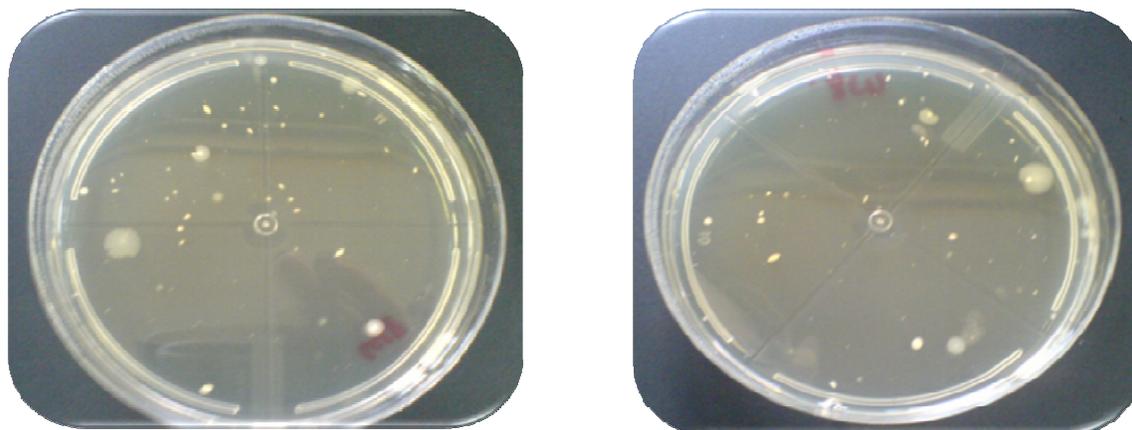


Figura 11. Crecimiento en placa de anaerobios totales.
(Agar Wilkins-Chalgren, 37°C, 48 h, anaerobiosis)
Muestra: Rata 10, Grupo K, Fase I

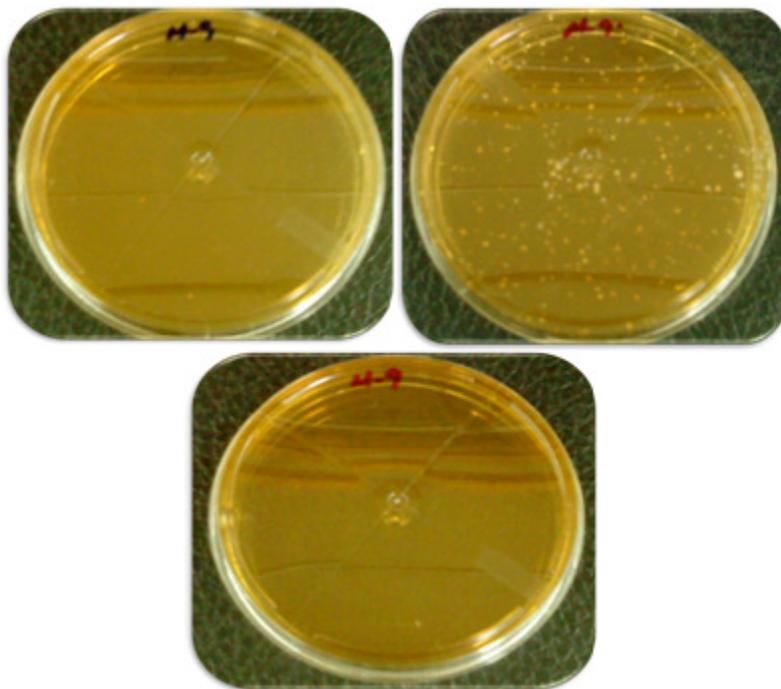


Figura 12. Crecimiento en placa de lactobacilos de los grupos testigo al final de la fase II (Agar MRS, 37°C, 48h, anaerobiosis)
Superior izquierda: TC, Superior derecha: TE, Inferior: TA.

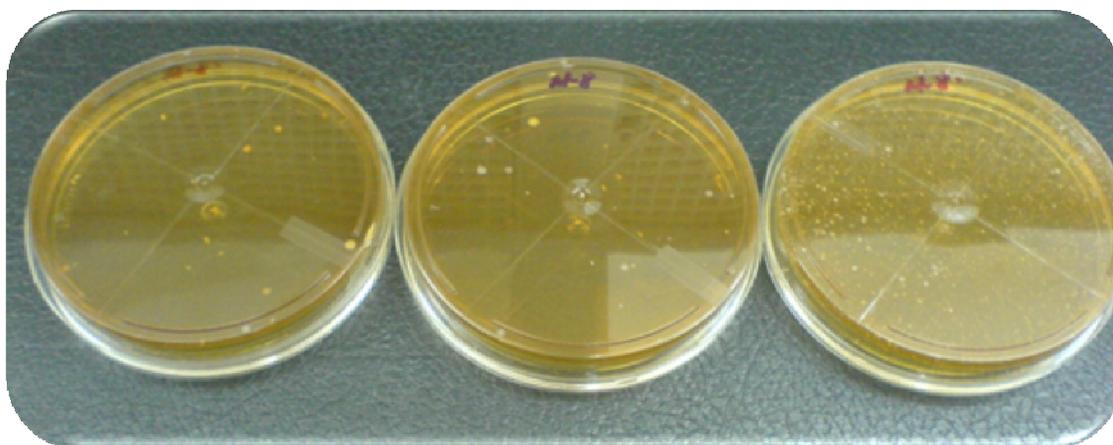


Figura 13. Crecimiento en placa de lactobacilos en grupos desnutridos y recuperados al final de la fase II. (Agar MRS, 37°C, 48h, anaerobiosis)
Izquierda: KA, Centro: KC, Derecha: KE



Figura 14. Prueba positiva de presencia de bifidobacterias (tubo de la izquierda)
y prueba negativa (tubo de la derecha).
(Medio Beerens, 37°C, 48h, anaerobiosis)

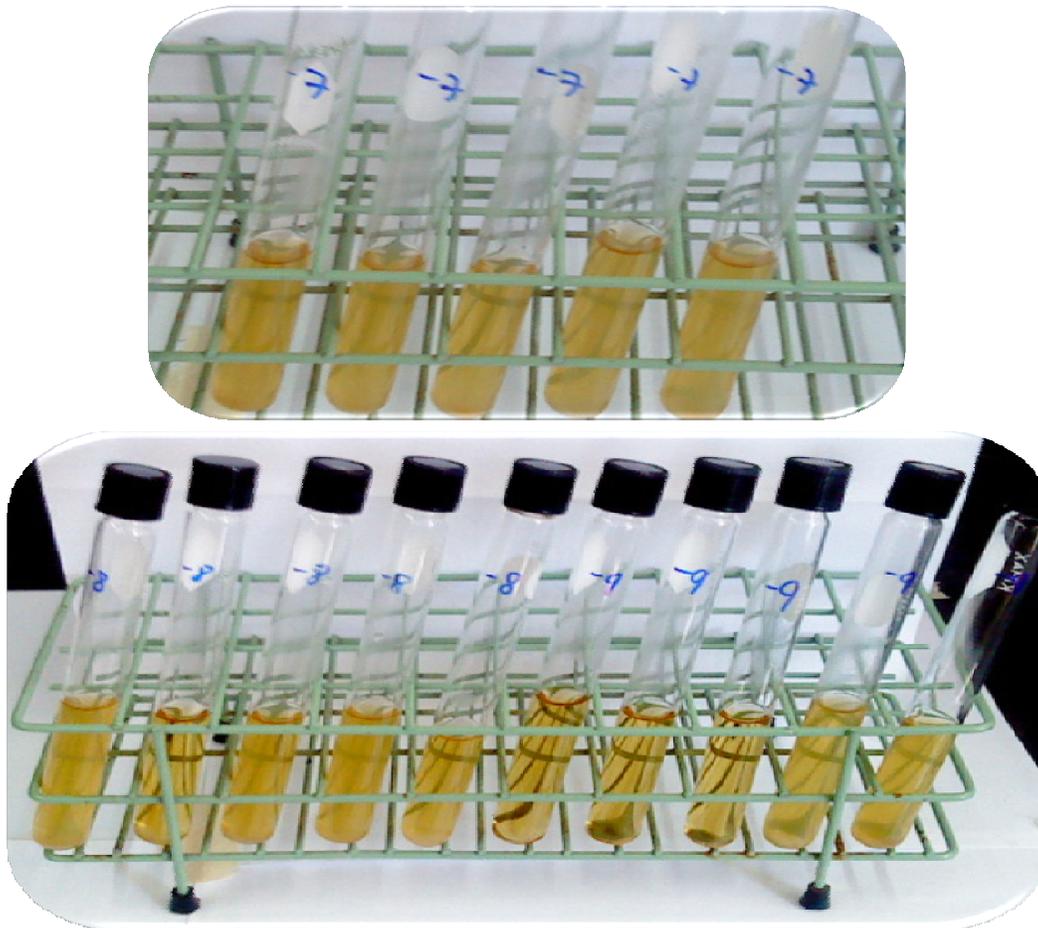


Figura 15. Crecimiento de bifidobacterias en las diferentes diluciones utilizadas.
(Medio Beerens, 37°C, 48h, anaerobiosis)
Muestra: KA, fase II

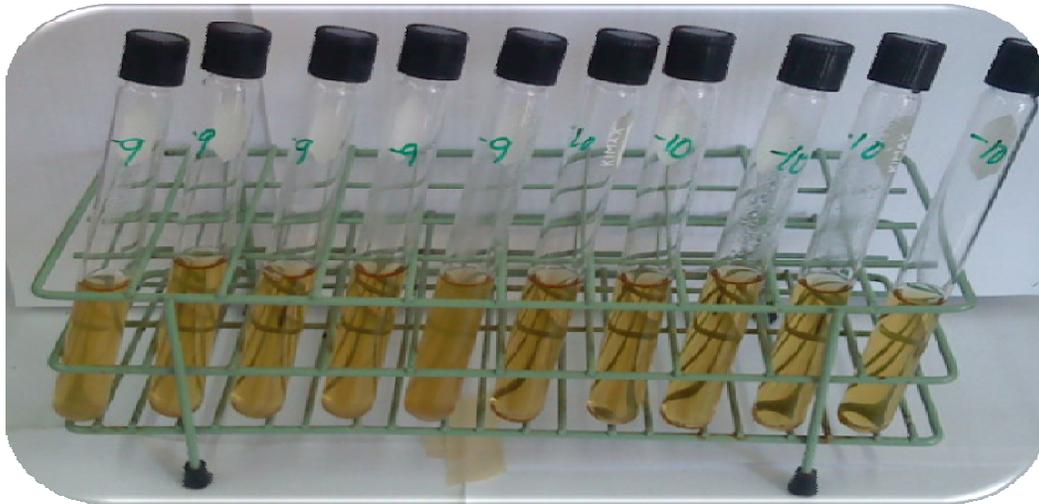


Figura 16. Crecimiento de bifidobacterias.
(Medio Beerens, 37°C, 48h, anaerobiosis)
Muestra: KC, fase II

ANEXO B. Índice de NMP y límites de confianza del 95% para varias combinaciones de resultados positivos, cuando se utilizan 5 tubos por dilución (10 ml, 1 ml y 0,1 ml)

Combinación de tubos positivos	Índice NMP/ 100 ml	Límites de Confianza 95%		Combinación de tubos positivos	Índice NMP/ 100 ml	Límites de Confianza 95%	
		Superior	Inferior			Superior	Inferior
0-0-0	< 2	---	---	4-3-0	27	12	67
0-0-1	2	1.0	10	4-3-1	33	15	77
0-1-0	2	1.0	10	4-4-0	34	16	80
0-2-0	4	1.0	13	5-0-0	23	9.0	86
1-0-0	2	1.0	11	5-0-1	30	10	110
1-0-1	4	1.0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-0	4	1.0	15	5-1-0	30	10	120
1-1-1	6	2.0	18	5-1-1	50	20	150
1-2-0	6	2.0	18	5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1.0	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2.0	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2.0	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3.0	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3.0	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	5.0	29	5-3-2	140	60	360
3-0-0	8	3.0	24	5-3-3	170	80	410
3-0-1	11	4.0	29	5-4-0	130	50	390
3-1-0	11	4.0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-1	14	6.0	35	5-4-2	220	100	580
3-2-0	14	6.0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-1	17	7.0	40	5-4-4	350	160	820
4-0-0	13	5.0	38	5-5-0	240	100	940
4-0-1	17	7.0	45	5-5-1	300	100	1300
4-1-0	17	7.0	46	5-5-2	500	200	2000
4-1-1	21	9.0	55	5-5-3	900	300	2900
4-1-2	26	12	63	5-5-4	1600	600	5300
4-2-0	22	9.0	56	5-5-5	> 1600	---	---
4-2-1	26	12	65				

NOM-112-SSA1-1994.