



00567
2
2e

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EL EFECTO DE LA DIETA RURAL MEXICANA EN LA
PERMEABILIDAD DE LA MUCOSA INTESTINAL.

TESIS QUE PRESENTA

PATRICIA MARGARET HAYWARD JONES
PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRA EN CIENCIA DE ALIMENTOS

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGOSTO DE 1994



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 está 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.

UNAM

Facultad de Química.

División de Estudios de Posgrado.

El efecto de la dieta rural mexicana en la
permeabilidad de la mucosa intestinal

Tesis que presenta

PATRICIA MARGARET HAYWARD JONES

para obtener el título de

Maestra en Ciencia de Alimentos.

Bajo la dirección del Dr. Jorge Luis Rosado Loría.

Jurado:

PRESIDENTE: Dr. Héctor Bourges.

PRIMER VOCAL: Dr. Ali Halhali Baghdad.

SECRETARIO: M en C. Angela Sotelo López.

PRIMER SUPLENTE: M en C. Bernardo Lucas.

SEGUNDO SUPLENTE: M en C. Angeles Valdivia López.

"Mi camino con corazón."

Las enseñanzas de Don Juan.

Carlos Castañeda.

To Mum, Dad and Glen.

To Jorge Luis Rosado, my supervisor.

To Elsa Muñoz for her technical expertise and friendship.

To Josefina Fernández for her constancy, support and mediatorship with San Caralampio.

To all the people on the first floor of the Subdirección General de Nutrición Experimental y Ciencia, above all Gladys López, Patricia López, Guadalupe Orozco, Laura Zavala and Teresa García for their cheerful cooperation.

To Marcela Palma and Bertha Sortero for preparing the diet goodies.

To all the volunteers for making my life easier by following the diet to the letter.

To Octavio Arellín of Millipore for solving problems.

To Agustín Reyó and Rocío Santillana for their help with the HPLC.

To Michael Pauly for helping me find my path with heart.

To Libby Williams for being there.

To Eduardo Carrillo for his second opinion.

To Vivián Hernández for being a good neighbour.

To the Food Chemistry Department at the-UNAM.

To Conacyt for providing the wherewithall.

To everyone, home and abroad, for putting up with my bad moods and long silences.

THANK YOU.

INDICE

I. INTRODUCCION.	Pg
1) La dieta rural y la permeabilidad intestinal.	8
2) Digestión y absorción como limitantes en la utilización de nutrimentos.	9
3) Factores que afectan los procesos de digestión y absorción.	10
4) La fibra.	11
5) La dieta consumida en zonas rurales marginales de México.	13
6) Factores de la dieta rural mexicana que pueden afectar la utilización de nutrimentos.	13
7) La permeabilidad intestinal y su importancia.	21
8) Factores de la dieta rural mexicana que pueden afectar la permeabilidad intestinal.	24
9) Métodos para medir la permeabilidad intestinal.	25
II. OBJETIVOS.	37
III. MATERIALES Y METODOS.	38
1) Establecimiento de la técnica para medir la permeabilidad intestinal.	38
a) Estandarización.	38
b) Recuperación.	39
c) Problemas de la técnica original; las modificaciones a la técnica.	40

2)	Evaluación del efecto de la ingestión de una dieta rural mexicana en la permeabilidad de la mucosa intestinal.	41
	a) Sujetos.	41
	b) Evaluación basal	41
	c) Formulación de la dieta.	43
	d) Determinación de la permeabilidad intestinal.	46
	e) Determinación de la fermentación colónica.	48
3)	Estadística.	51
IV.	RESULTADOS.	52
1)	Características de los sujetos.	52
2)	Contenido de nutrimentos de la dieta experimental.	53
3)	Pruebas de la permeabilidad intestinal.	56
	a) Estandarización.	56
	b) Recuperación.	60
	c) Mediciones.	60
4)	Pruebas de la fermentación colónica.	66
5)	Asociaciones entre los resultados de las pruebas de la permeabilidad intestinal y las de la fermentación colónica.	66
V.	DISCUSION.	70
VI.	RECOMENDACIONES.	79

VII. ANEXOS.	82
1) Anexo 1 - Registro de alimentos de 24 horas y la relación de la frecuencia semanal de consumo de alimentos.	82
2) Anexo 2 - Menús de la dieta del estudio	83
3) Anexo 3 - Métodos utilizados en los análisis químicos proximales de la dieta experimental.	97
VIII. BIBLIOGRAFIA.	103

INDICE DE TABLAS

	Pg.
1. Categorías y cantidades de alimentos incluidos en una dieta rural mexicana promedio.	14-15
2. Promedios de los porcentajes de la lactulosa y del manitol recuperados, y la relación de lactulosa/manitol informados en los estudios que utilizaron una solución iso-osmolar en la prueba de la permeabilidad intestinal.	24A
3. Promedios de los porcentajes de la lactulosa y del manitol recuperados, y la relación de lactulosa/manitol informados en los estudios que utilizaron una solución hiperosmolar en la prueba de la permeabilidad intestinal.	24B
4. Resumen de las ventajas y desventajas más importantes de los métodos utilizados para medir la permeabilidad de la mucosa intestinal.	35A
5. Peso y talla inicial para calcular la energía de mantenimiento teórica de las voluntarias.	54
6. Ingestión media diaria de fibras totales en la dieta habitual de los sujetos basada en los registros de alimentos de 24 horas.	55
7. Valores teóricos provenientes de varias fuentes y los valores experimentales de los duplicados de los 7 menús elaborados para los dos periodos de la administración de la dieta.	57-8

8. Cálculo del cambio de peso durante la dieta para verificar si la dieta aportó suficiente energía para el mantenimiento.	59
9. Mediciones de los porcentajes recuperados de lactulosa y manitol y su relación a las 0 semanas.	62
10. Mediciones de los porcentajes recuperados de lactulosa y manitol y su relación a las 3 semanas.	63
11. Mediciones de los porcentajes recuperados de lactulosa y manitol y su relación a las 6 semanas.	64
12. Análisis de las relaciones de lactulosa/manitol de los períodos experimentales (0, 3 y 6 semanas).	65
13. Resultados de la comparación entre los tiempos de tránsito (0, 3 y 6 semanas).	67-8
14. Resultados de la comparación entre los volúmenes de hidrógeno espirado en las seis horas de la prueba (0, 3 y 6 semanas).	69
15. Resumen de las condiciones de las mediciones de Fe, Mg, Zn y Ca por el método de espectrofotometría de absorción atómica.	100

INDICE DE FIGURAS

	Pg.
1. Diagrama del aparato digestivo humano.	9A
2. Factores de la absorción intestinal que la fibra dietética puede afectar.	16A
3. A) Diagrama que muestra el desarrollo de las células de la pared intestinal.	19A
B) Sección de la mucosa intestinal con las vellosidades y las criptas.	
4. Mecanismo general de la absorción y del transporte de macromoléculas por la pared intestinal.	22A
5. Fórmulas químicas: a) la lactulosa; b) el manitol c) la celobiosa; d) la ramnosa; e) la xilosa.	27A
6. Diagrama de flujo del diseño experimental del estudio piloto.	41A
7. Diagrama de flujo para las mediciones de lactulosa/manitol en la orina.	47A
8. Esquema del equipo de medición con HPLC (Cromatografía de líquidos a alta presión).	48A.
9. Esquema del flujo por el equipo Quintron MicroLyzer.	49A
10. Curva patrón de la lactulosa.	56A
11. Curva patrón del manitol.	56B
12. Las relaciones de lactulosa/manitol de cada individuo y los promedios de todas las relaciones a las 0, 3 y 6 semanas.	65A

- | | |
|---|-----|
| 13. Asociación entre tiempos de tránsito (min.)
y a la relación lactulosa/manitol en la
orina a las 0, 3 y 6 semanas. | 69A |
| 14. Asociación entre volúmenes de hidrógeno espirado
y la relación de lactulosa/manitol en la orina
a las 0, 3 y 6 semanas. | 69B |
| 15. Asociación entre las concentraciones de la
lactulosa y del manitol a las 0, 3 y 6 semanas. | 69C |
| 16. Método oficial AOAC para medir la fibra dietética
total. | 97A |

I. INTRODUCCION.

1) La dieta rural y la permeabilidad intestinal.

En un estudio anterior (Rosado et al., 1992), se evaluó el efecto en la absorción de los nutrimentos de una dieta representativa de la dieta habitual en zonas rurales de México (DRM), comparándola con una dieta urbana promedio más refinada. La ingestión de fibra "neutro-detergente" fue aproximadamente de 40g por día con la dieta rural y únicamente de 12g por día con la dieta urbana. Se encontró, entre otras consecuencias, que la dieta rural produjo una disminución en la ingestión de energía y un aumento en el peso de las heces, además de una disminución en la absorción aparente y en el balance de energía, nitrógeno, zinc, hierro, y calcio. Aunque la ingestión de los micronutrimentos fue más alta en el caso de la dieta rural, su disponibilidad fue menor. Un estudio similar (Calloway y Kretsch, 1978) utilizando alimentos comúnmente incluidos en una dieta rural guatemalteca parecida a la mexicana, mostró resultados similares.

Uno de los posibles mecanismos de que la dieta rural produzca una disminución en la absorción de varios nutrimentos es que los componentes de la dieta rural modifiquen la capacidad de absorción en la mucosa intestinal por la alteración de su permeabilidad. Se encontró un estudio en ratas donde se informó un aumento en la permeabilidad de la mucosa intestinal después de 2 semanas con una dieta adicionada con celulosa purificada (Shiau y Chang, 1986). Los estudios de Willems et al. (1993) y Barau y Dupont (1990) con niños informaron valores mayores de permeabilidad cuando ingerieron

alimentos que les causaban problemas intestinales. Finalmente, en el estudio de Bjarnason et al. (1988) con adultos sanos, se encontraron valores cada vez más elevados de permeabilidad después de ingerir comida hindú progresivamente más picosa, "Biryani" < "Bhuna" < "Vindaloo". Sin embargo, a la fecha no se han informado estudios en los que se hayan investigado los cambios en la permeabilidad de la mucosa intestinal en adultos sanos después de la ingestión de una dieta basada en alimentos vegetales como la dieta rural utilizada en el presente estudio. Se diseñó, entonces, este estudio para investigar la hipótesis de que la disminución en la absorción de varios nutrimentos se debe a que los componentes de la dieta rural modifiquen la capacidad de absorción en la mucosa intestinal por la alteración de su permeabilidad.

2) Digestión y absorción como limitantes en la utilización de nutrimentos.

El aparato digestivo humano mide de 8 a 9 metros (Figura 1), la mayor parte la constituye el intestino delgado que mide aproximadamente 6 metros. Los alimentos se quedan en promedio de 3 a 5 horas en el estómago, 4 horas en el intestino delgado y de 4 a 20 horas en el intestino grueso. La digestión ocurre principalmente en el estómago y en el intestino delgado. El intestino delgado también es el lugar más importante para la absorción. La mayor parte de lo que se absorbe en el intestino pasa por la vena porta al hígado, donde es sometido a los procesos metabólicos, según las necesidades del cuerpo. Lo no metabolizado,

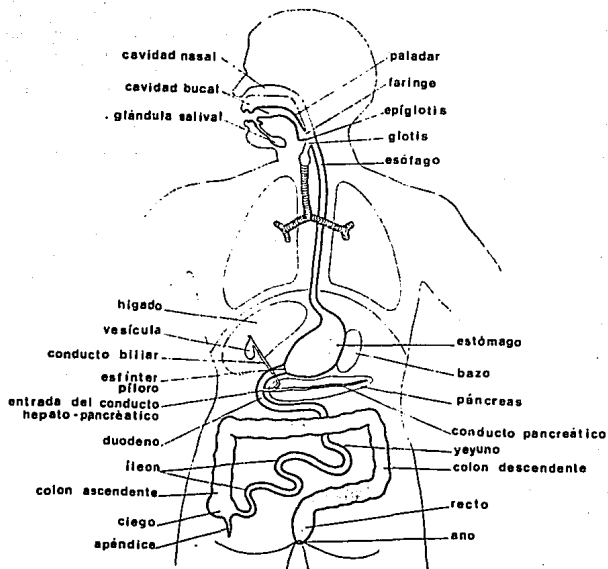


Fig. 1: Diagrama del aparato digestivo humano (Roberts, 1979)

y también parte de lo metabolizado sigue su camino en la circulación hasta llegar al riñón. Después de una serie de procesos, se excreta en la orina. El material indigerible pasa al intestino grueso. Cuando llega al recto, su contenido de agua ya se redujo de manera considerable. El contenido del recto (las heces) consiste principalmente de celulosa indigestible, células epiteliales y grandes cantidades de bacterias colónicas, sobre todo E. coli.

Las secreciones del aparato digestivo se mezclan con los alimentos previamente modificados por la masticación, ayudadas por las contracciones rítmicas del estómago y del intestino delgado. Las secreciones sirven para degradar las macromoléculas de los alimentos en sus partes constituyentes, lo que permite su absorción posterior. La absorción ocurre principalmente en el intestino delgado, aunque hay algo de absorción en el estómago. Las microvellosidades de la pared intestinal, que contienen enzimas, aseguran una mayor superficie absorbente, capaz de absorber los productos de la digestión o de completar los últimos pasos de la digestión antes de la absorción. La absorción puede ocurrir por difusión pasiva, por transporte facilitado, o por transporte activo; se mantiene un buen contacto de los productos de la digestión con la pared intestinal por las contracciones mezcladoras del intestino delgado.

3) Factores que afectan los procesos de digestión y absorción.

Los factores más importantes que afectan los procesos de digestión

y absorción son los siguientes (Iber, 1980):

- a) las enfermedades de la cavidad oral como dientes rotos, adoncia, infecciones virales o cáncer de la mandíbula.
- b) la extirpación del estómago, o una parte de él.
- c) la disminución de las secreciones necesarias para la digestión en cualquier parte del aparato digestivo.
- d) las enfermedades que afectan los músculos del intestino delgado, por ejemplo la diabetes.
- e) el kwashiorkor.
- f) las infestaciones por parásitos.
- g) la sensibilidad al gluten.
- h) la obstrucción de los ganglios linfáticos.
- i) la deficiencia de proteínas o ácido fólico.
- j) la ingestión de fibra dietética.

A continuación se describe con mayor detalle la fibra dietética.

4) La fibra.

La fibra dietética puede definirse fisiológica, botánica o químicamente.

Fisiológicamente, se puede decir que la fibra dietética incluye los polisacáridos y la lignina no digeridos por las enzimas del intestino delgado de los humanos (Trowell et al., 1976; Southgate, 1982; Dreher, 1987); están asociados con las paredes celulares de las plantas. Las bacterias colónicas, por otro lado, pueden digerir hasta cierto grado la fibra dietética, produciendo ácidos grasos de cadena corta entre otras sustancias (Dreher, 1987).

Botánicamente, se han clasificado estos compuestos en tres categorías según su función en plantas:

- a) los polisacáridos estructurales (celulosa, hemicelulosa, y algunas pectinas)
- b) los polisacáridos no estructurales (pectinas, gomas y mucílagos)
- c) los no polisacáridos (lignina) (Schneeman, 1986).

Los métodos de la medición de fibra en alimentos demuestran sus diferencias químicas tanto en la cadena base como en sus ramificaciones. Los métodos de fibra bruta y de fibra ácido detergente subestiman el contenido de fibra total porque no miden ni la hemicelulosa ni las pectinas. El método de fibra neutro detergente también subestima la fibra total por su incapacidad de medir las pectinas. El método enzimático sobrestima ligeramente la fibra total porque mide sustancias no degradadas por las enzimas empleadas por el método, ej. el almidón resistente. La fibra dietética total (FDT) incluye la fibra soluble e insoluble en los alimentos.

Hay otros hidratos de carbono, tales como la lactulosa, la lactosa (en malos digestores de la lactosa), el almidón resistente a la alfa-amilasa (aproximadamente 15-20% del almidón en la dieta) y la rafinosa que también son resistentes a las enzimas digestivas humanas, pero no se consideran dentro de la definición clásica de la fibra dietética (Bingham, 1987).

5) La dieta consumida en zonas rurales marginadas de México.

Esta dieta (Tabla 1) está basada en tortillas, frijoles, verduras y frutas y contiene una cantidad importante de fibra dietética; en el presente trabajo se denomina como la dieta rural mexicana (DRM). Las tortillas y los frijoles proporcionan la mayoría de la energía y de la proteína. La inclusión de productos animales no es frecuente.

6) Factores en la dieta rural que pueden afectar la utilización de nutrimentos.

Existen factores en la dieta rural mexicana que pueden aumentar o disminuir la utilización de los nutrimentos. La DRM es una dieta basada en alimentos de origen vegetal; se caracteriza por tener un alto contenido de fibra, aproximadamente cuatro veces mayor que una dieta urbana mexicana promedio. También hay cantidades mayores de calcio, hierro, y de las vitaminas A y C. En cantidades menores se encuentran la grasa, el sodio y el colesterol. La energía en su mayoría proviene de los hidratos de carbono (70%), 11% de las proteínas y 19% de las grasas. La proteína, comparada con la de la dieta urbana también está presente en cantidades menores, y en su mayoría viene de plantas, no de origen animal (Rosado et al., 1991).

Existen numerosos estudios que demuestran los efectos benéficos de la ingestión en cantidades adecuadas de fibra dietética (Cassidy et al., 1982; Wrick et al., 1983; Schneeman, 1987; Dreher, 1987; Rosado et al., 1989). Sin embargo, estos efectos benéficos depende

TABLA 1

CATEGORIAS Y CANTIDADES DE ALIMENTOS INCLUIDOS

EN UNA DIETA RURAL MEXICANA PROMEDIO (Rosado et al., 1992)

<u>Alimento</u>	Cantidad, g/d (valores promedios \pm DE)
Proteína animal	
Queso Oaxaca	38 \pm 8
Cereales y Leguminosas	
Tortillas de maiz	502 \pm 108
Elotes	322 \pm 68
Atole	53 \pm 16
Pasta (trigo)	87 \pm 18
Frijol negro	180 \pm 39
Verduras	
Hongos	80 \pm 17
Lechuga	16 \pm 3
Jitomate	595 \pm 128
Tomate	189 \pm 60
Calabacita	120 \pm 25
Ejote	80 \pm 17
Chile poblano	120 \pm 25
Nopales	435 \pm 137

Frutas

Papaya	312 ± 89
Sandía	202 ± 197
Melón	121 ± 146
Naranja	80 ± 17
Jícama	195 ± 56

del tipo de fibra dietética ingerida (gelificante o celulósica). La fibra afecta el funcionamiento del tracto digestivo a varios niveles desde la ingestión hasta la defecación, teniendo implicaciones en la obesidad, estreñimiento, enfermedad diverticular, y el cáncer del colon y del recto (Fig. 2). La fibra afecta el proceso de digestión y absorción por sus propiedades físicas:

a) la viscosidad, que reduce el contacto enzima-sustrato y da resistencia al efecto propulsor de las contracciones del tracto gastrointestinal (Brown et al., 1979; Isaksson et al., 1982; Schneeman, 1982). La fibra dietética con propiedades gelificantes disminuye el tránsito intestinal, mientras que la fibra celulósica lo aumenta; de esta manera los polisacáridos viscosos "estabilizan" el contenido gástrico, y hacen que se forme un gel, aumentando la masa de este contenido (Cassidy et al., 1982; Leeds, 1982; Jacobs, 1983; Edwards, 1990).

Los sólidos normalmente se vacían del estómago más lentamente que los líquidos (Leeds, 1982). En una dieta alta en fibra mixta, el resultado puede ser un tiempo de tránsito menor (Burkitt et al., 1972) o mayor (Edwards, 1990) dependiendo de la viscosidad del bolo alimenticio, lo que depende del contenido exacto de la dieta. El tiempo de tránsito es directamente proporcional a la viscosidad (Flourié, 1992).

b) la capacidad de retener el agua (Jacobs et al., 1983). Esta propiedad afecta el peso de las heces, la velocidad del tiempo de tránsito y la absorción de los nutrientes. Un tránsito más rápido

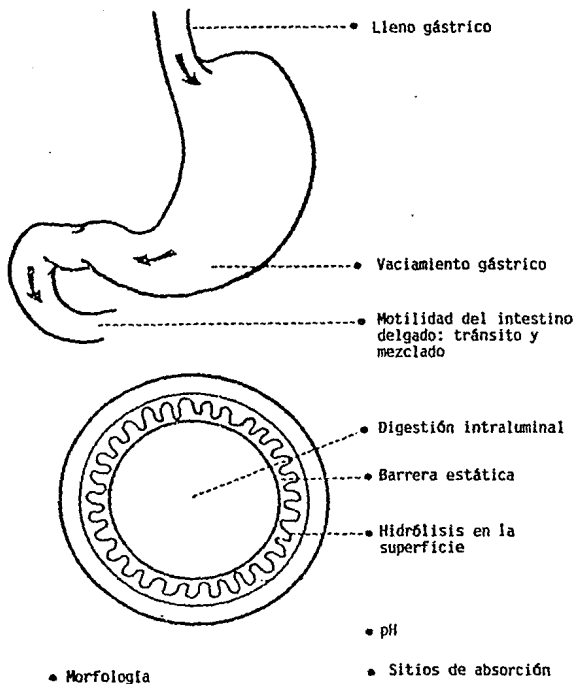


Fig. 2: Factores de la absorción intestinal que la fibra dietética puede afectar

implica un contacto menor de posibles carcinógenos con el tracto digestivo (Cassidy et al., 1981 y 1990; Shiau y Chang, 1986; Southgate, 1992), pero baja también el tiempo de contacto de los nutrimentos con la superficie absorbente; no obstante, esto no implica que también baja la cantidad total absorbida (Leeds, 1982; Schneeman, 1990). Para algunos nutrimentos, especialmente los hidratos de carbono, existen evidencias que la biodisponibilidad no se ve seriamente afectada porque hay una proliferación de actividad fermentativa en el intestino grueso. La absorción sólo se desplaza a sitios más distales del intestino (Calvert et al., 1985; Vahouny y Cassidy, 1985; Edwards, 1990; Jenkins et al., 1990; Schneeman, 1990; Flourié, 1992; Read y Eastwood, 1992). Un bolo alimenticio mayor puede diluir el contenido de las enzimas y de los nutrimentos absorbibles en el intestino (Schneeman, 1982), o encarcelar las moléculas de los alimentos, lo que no permite el acceso de las enzimas digestivas (Read y Eastwood, 1992).

c) las interacciones con otros compuestos. Los efectos de la fibra en los ácidos biliares baja por consecuencia la absorción del colesterol y de las lipoproteínas de baja densidad, los dos asociados con la arteroesclerosis. En algunos alimentos de origen vegetal, existen sustancias que afectan su propia digestión; por ejemplo, el salvado contiene un inhibidor de la actividad de las lipasas; en los frijoles hay un inhibidor de la tripsina y quimotripsina en el intestino delgado (Acosta, 1988); la sílica, los taninos y las saponinas reducen la absorción (Dreher, 1987); debido al ácido oxálico en las verduras se absorbe menos calcio

(Rossander et al., 1992); el ácido fólico, quince veces más concentrado en una dieta alta en fibra, como es la DRM, impide la absorción de algunos nutrimentos (calcio, hierro, magnesio, zinc, manganeso, vitaminas A, B6 y B12) (Reinhold, 1972; Reinhold et al., 1973 y 1982; Walker, 1975; Calloway y Kretsch, 1978; Davies, 1979 y 1982; Sandberg, 1981; Kelsay, 1982; Oku et al., 1982; Gordon et al., 1983; Sigleo et al., 1984; Davies y Nightingale, 1985; Sandstrom et al., 1987; Dreher, 1987; Swindell y Johnson, 1987; Fairweather-Tait y Wright, 1990; Rosado et al., 1992), porque forman complejos que hacen que estos nutrimentos sean absorbidos pobremente. El hecho de que la mayoría de estos nutrimentos existen en cantidades altas en la DRM hace que el balance final esté del lado positivo (Gordon et al., 1983; Dreher, 1987; Schneeman, 1989).

d) la capacidad de su fermentarse en presencia de las bacterias colónicas (Iber, 1980; Schneeman, 1982 y 1987; Vahouny et al., 1985; Edwards, 1990). Indirectamente, la fibra afecta al metabolismo de la glucosa y los lípidos, lo cual puede tener implicaciones en la patogénesis de la diabetes mellitus, la arteroesclerosis, y quizá en el desarrollo de cálculos biliares (Leeds et al., 1982; Munoz, 1982; Wolever, 1989; Jenkins et al., 1990). Las pectinas y las gomas causan una disminución en la respuesta glicémica debido en parte a la demora en el paso del quimo del estómago al intestino delgado (Leeds, 1986; Sigleo, 1984). En presencia de fibra celulósica la actividad de algunas enzimas pancreáticas puede reducirse modificando la absorción de

los nutrientes (Schneeman y Gallaher, 1980; Dunaif y Schneeman, 1981; Story y Thomas, 1982; Vahouny, 1982; Isaksson et al., 1982).

Esto se puede atribuir a una alteración en la solubilización o en la hidrólisis de los alimentos en el intestino delgado (Schneeman, 1987). La baja absorción de energía, de nitrógeno y de ácidos grasos resulta en un aumento de ellos en las heces (Calloway y Kretsch, 1978; Rosado et al., 1992). Se considera que la pérdida de grasas en las heces de adultos sanos con una dieta alta en fibra tiene poco significado nutricional (Johnson, 1992), y un estudio de Walker (1975) mostró que la mayor parte del incremento de nitrógeno y de grasas en las heces es de origen endógeno, no de los alimentos ingeridos no absorbidos.

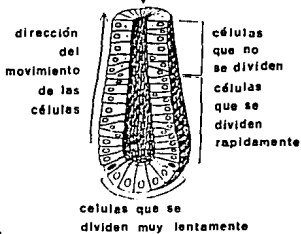
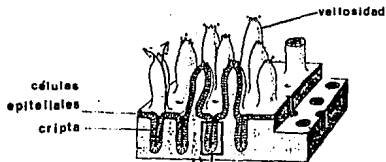
e) la necesidad de masticar más tiempo los alimentos con contenido alto de fibra, lo que puede disminuir la cantidad ingerida en una comida (Leeds et al., 1982; Rosado et al., 1991).

En varios estudios sobre el efecto de la fibra dietética en la morfología del intestino delgado (Fig.3) (Schenk et al., 1972; Brown et al., 1979; Cassidy et al., 1981; Schneeman, 1982 y 1989; Gordon et al., 1983; Jacobs, 1983; Jacobs y White, 1983; Tasman-Jones et al., 1983; Jacobs y Lupton, 1984; Johnson, 1984; Sigleo, 1984; Cooper y Ukabam, 1984; Ford, 1985; Vahouny et al., 1985; Juby et al., 1987; Paulini et al., 1987; Acosta, 1988; Lunn, 1991; Sullivan et al., 1991) se han observado los siguientes fenómenos:

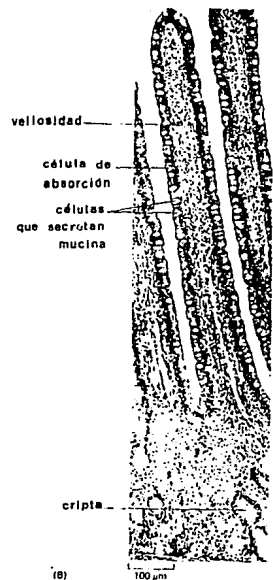
f) la disminución en el número de microvellosidades, microvellosidades desaparecidas, o necrosis de células.

g) el aumento en el grosor de las microvellosidades.

YBI



(A)



(B)

Fig. 3: A) Diagrama que muestra el desarrollo de las células de la pared intestinal. Las células "nacen" en el fondo de las criptas, y migran hasta la punta de la vellosidad (3 a 5 días).
B) Sección de la mucosa intestinal con las vellosidades y las criptas.
(Alberts et al; 1983)

h) la proliferación de células. Esta proliferación indica un aumento en los enterocitos inmaduros, pero la baja absorción no se debe totalmente a ello (Gordon et al., 1983).

i) el aumento en la profundidad de las criptas de Lieberkühn, el cual se asocia con una menor actividad enzimática de las microvellosidades.

j) la mayor actividad de las células caliciformes, las cuales producen mayores cantidades de mucina, una parte importante en la barrera estática del intestino delgado. Esta barrera puede limitar la velocidad de absorción sobre todo de los compuestos liposolubles (Schneeman, 1982; Johnson, 1992), y de los hidratos de carbono (Flourié, 1992), o ayudar al paso más rápido del bolo alimenticio (Cassidy et al., 1990).

k) el aumento en el volumen del intestino, quizá para manejar el mayor volumen de alimentos y la disminución en la absorción.

En unos estudios sobre el efecto de la fibra dietética en la morfología del intestino grueso, se encontró una hiperplasia colónica (un incremento anormal en el número de células) debido a un aumento en la exfoliación de células (Cassidy et al., 1982; Jacobs y Lupton, 1984). Se cree que la fibra dietética puede interactuar con factores que influyen en la proliferación celular. Existen otros estudios, sin embargo, donde no se encontró ningún efecto en la mucosa intestinal después de la ingestión de una dieta de salvado durante 4 semanas (Schneeman, 1982; Stock-Damgé et al., 1984).

De todo lo anterior destaca la posibilidad de que la DRM puede causar cambios en la mucosa intestinal que den lugar a una permeabilidad mayor a solutos normalmente absorbidos en cantidades menores, lo que se explica con más detalles a continuación.

7) La permeabilidad intestinal y su importancia.

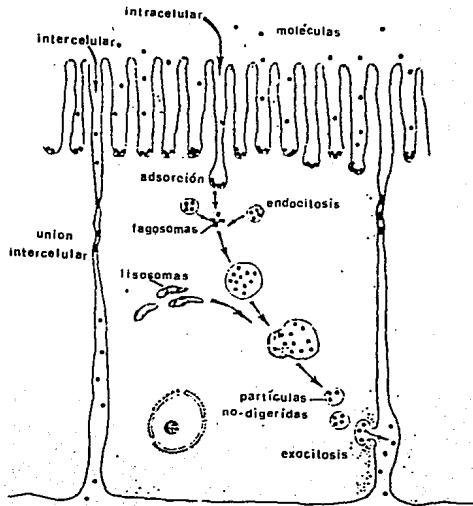
La absorción puede definirse como el flujo del soluto a través de una membrana en un tiempo definido independientemente del área de la membrana involucrada. La permeabilidad puede definirse como la velocidad del soluto a través de una área definida de una membrana en un tiempo definido (Lifschitz, 1985). La permeabilidad es la facilidad con que el contenido del intestino delgado puede atravesar la membrana intestinal mediante difusión pasiva. Los factores que juegan un papel en la cantidad que se difunde son: el gradiente de la concentración, el área de la mucosa, el tiempo y la naturaleza del soluto, si es hidrosoluble o liposoluble. Las sustancias liposolubles pueden atravesar la pared del intestino delgado por las células epiteliales aun cuando su peso molecular sea grande. Se forman los quilomicrones que ayudan en este proceso de transferencia del lumen del intestino al torrente sanguíneo (Roberts, 1979). Por otro lado, la permeabilidad del intestino delgado en el caso de los solutos hidrosolubles depende de su tamaño molecular (Fordtran et al., 1965; Loehry et al., 1970). Las moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular (ej. los monosacáridos y el manitol) cuya absorción se utiliza para investigar la permeabilidad intestinal se absorben a través de la

membrana lipídica por las regiones polares que existen en la estructura de la membrana: los poros acuosos (Loehry et al., 1970) (Fig. 4). Las moléculas hidrofílicas de mayor peso molecular también utilizadas para este fin (ej. los disacáridos y el EDTA) no se difunden por la vía intracelular, sino por una ruta intercelular, entre enterocitos adyacentes (Fig. 4), y esto sólo ocasionalmente (Menzies, 1979, Walker y Isselbacher, 1974; Anónimo, 1985, Elia, 1987, Isolauri, 1989, Willems, 1993). Los hidratos de carbono denominados no absorbibles (ej. lactulosa y manitol) se absorben en cantidades mínimas, sin importancia para la nutrición (Walker y Isselbacher, 1974). Fue necesario revisar otros estudios que utilizaron los mismos azúcares que los del presente estudio: la lactulosa y el manitol. Se revisaron las cantidades recuperadas más bajas para asegurar que el método empleado sería capaz de medir hasta el valor más bajo informado. Los valores más bajos informados de la absorción de los azúcares utilizados en el presente estudio en adultos sanos son los siguientes:

0.34% de la dosis administrada de lactulosa (Lunn et al., 1991).

0.42% de la dosis administrada del manitol (Behrens et al., 1984).

Si hay daño a la mucosa intestinal, la absorción de moléculas hidrosolubles más pequeñas disminuye, porque el daño afecta negativamente la superficie absorbente, y los poros acuosos dejan pasar menos solutos de bajo peso molecular. Al mismo tiempo aumenta la absorción pasiva de moléculas hidrosolubles más grandes, porque el daño afloja la unión entre enterocitos, o causa una



22A

Fig. 4: Mecanismo general de la absorción y del transporte de macromoléculas por la pared intestinal. (Walker y Isselbacher, 1974)

pérdida de células que resulta en una superficie menor de absorción (Dupont y Goutail-Flaud, 1990; Willems et al., 1993), lo que deja pasar más solutos de mayor peso molecular por estas vías (Menzies, 1979; Cobden, 1979; Isolauri, 1989).

Loehry et al. (1973) demostraron que en sujetos sanos hay una reducción en la permeabilidad de compuestos de peso molecular entre 60 y 40,000 desde el duodeno hasta el ileón terminal debido a una reducción en el número total de poros acuosos presentes. Por esto, hay una mayor absorción por difusión pasiva en el intestino delgado proximal. Una mucosa intestinal dañada, detectable por un aumento en la permeabilidad, deja de funcionar como una estructura viable de absorción intracelular; además, lo absorbido puede regresar al lumen por la misma vía intercelular por la cual pasan al plasma las moléculas hidrofílicas de peso molecular mayor; se abre el paso de dos vías (Walker y Isselbacher, 1974).

La integridad de la mucosa intestinal es indispensable para la salud. El daño a esta integridad, indicado por una permeabilidad intestinal elevada a moléculas de tamaño mayor ej. lactulosa, indica que pueden estar pasando también al organismo sustancias indeseables tales como los antígenos ingeridos y cantidades tóxicas de productos de origen bacteriano como enzimas proteolíticas e hidrolíticas, los cuales son citados como posibles fuentes de enfermedades gastrointestinales o sistémicas, tales como la enfermedad celiaca, la enfermedad inflamatoria del intestino, la hepatitis activa crónica y enfermedades autoinmunes (Walker y Isselbacher, 1974; Bjarnason et al., 1984; Lifschitz, 1985;

Isolauri, 1989; Cassidy et al., 1990).

8) Factores de la dieta que pueden afectar la permeabilidad intestinal.

El paso de una cantidad abundante de fibra dietética por el intestino puede provocar daño físico a la mucosa intestinal, modificando las células, aflojando las uniones entre enterocitos o dañando los poros acuosos. El resultado puede ser un aumento en la permeabilidad intestinal a solutos normalmente no absorbidos o poco absorbidos. Se puede apreciar este aumento en la permeabilidad cuando hay un aumento en la relación de lactulosa/manitol en la orina (ver sección I-9) En las Tablas 2 y 3, se resumen los intervalos de los promedios informados de esta relación en estudios anteriores. En términos generales, hay una relación de lactulosa/manitol mayor cuando se trata de gente con enfermedades intestinales que tiene la mucosa intestinal dañada lo que se asocia con una permeabilidad elevada (0.01-0.48 comparado con 0-0.107 con una solución iso-osmolar en niños; 0.046-0.67 comparado con 0.005-0.015 con una solución iso-osmolar en adultos; 0.66-13.19 comparado con 0.12-3.1 con una solución hiperosmolar en niños; 0.12-0.26 comparado con 0.016-0.03 con una solución hiperosmolar en adultos). No hay valores fijos de lo que representa una permeabilidad elevada; por ello es necesario compararlos con los valores de sujetos sanos. Aun entre éstos, hay una gran variación de valores "normales" (ej. 0.12-3.1 con una solución hiperosmolar en niños); utilizar el sujeto como su mismo testigo evita los problemas de

		ENFERMEDAD							SANOS
		Diarrea	Alergias	Vellosidades atróficas	Enf. Crohn	Enf. celiaca	Quemados	FQ	
% L	N	0.37 - 0.63 (1)	1.46 - 2.6 (1)	0.06 - 0.6 (1)	0.36 (1)	NR	NR	NR	0.79 - 1.17 (1)
	A	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0.32 (4)
% M	N	1.43 - 4.3 (1)	6.0 - 16.3 (1)	1.1 - 10.0 (1)	0.3 (1)	NR	NR	NR	10.9 - 21.6 (1)
	A	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	31.07 (4)
L/M	N	0.118 - 0.32 (1) 0.01 - 0.46 (2)	0.103 - 0.266 (1)	0.103 - 0.16 (1)	1.2 (1)	NR	NR	NR	0 - 0.107 (1, 2)
	A	NR	NR	NR	NR	0.046 - 0.67 (3)	NR	NR	0-006 - 0.016 (3)

N = niños; A = adultos; NR = no-reportado ; FQ = Fibrosis quística.

L = lactulosa; M = manitol ; L/M = relación lactulosa/manitol

(1) referencias después de la Tabla 3.

Tabla 2: Promedios de los porcentajes de la lactulosa y del manitol, y la relación de lactulosa/manitol informados en los estudios en los que utilizó una solución iso-osmolar en la prueba de la permeabilidad intestinal.

		ENFERMEDAD							SANOS
		Diarrea	Alergias	Vellosidades atróficas	Enf. Crohn	Enf. celíaca	Quemados	FQ	
% L	N	0.34 (6)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	A	NR	NR	NR	NR	0.24 - 4.9 (11, 12) 0.2 - 2.0 (13)	2.11 (16)	2.72 (17)	0.091 - 0.82 (11, 12, 16, 18, 19)
% M	N	4.4 (6)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	15.1 (8)
	A	NR	NR	2.04 (10)	NR	0.97 (14) 10.18-11.12 (12, 16)	21.72 (16)	27.3 (17)	0.424-2.9 (10, 16) 11.88 (16) 18.9 - 32.09 (12, 14, 16, 18, 17)
L/M	N	0.86-2.85 (6, 7) 13.19 (8)	4.57 - 5.39 (9)	NR	NR	NR	NR	NR	0.12 - 3.1 (6, 8)
	A	NR	NR	NR	NR	0.183 (12)	0.28 (16)	0.12 (17)	0.018 - 0.03 (12, 16, 17, 18, 19)

N = niños; A = adultos; NR = no-reportado; FQ = Fibrosis quística

L = lactulosa; M = manitol; L/M = relación lactulosa/manitol

() referencias después de la Tabla 3.

Tabla 3: Promedios de los porcentajes de la lactulosa y del manitol, y la relación de lactulosa/manitol informados en los estudios en los que utilizó una solución hiperosmolar en la prueba de la permeabilidad intestinal.

REFERENCIAS DE LAS TABLAS 2 Y 3.

Estudio	Método
1. Willems <u>et al.</u> , 1993.	C
2. Isolauri <u>et al.</u> , 1989.	A
3. Cooper y Ukabam, 1984.	A
4. Harris <u>et al.</u> , 1992.	A/B
5. Lunn <u>et al.</u> , 1991.	B
6. Behrens <u>et al.</u> , 1987.	B
7. Sullivan <u>et al.</u> , 1992.	B
8. Dupont y Goutail-Flaud, 1990.	A
9. Barau y Dupont, 1990.	A
10. Behrens <u>et al.</u> , 1984.	B
11. Menzies <u>et al.</u> , 1979.	B
12. Juby <u>et al.</u> , 1989.	D
13. Gomes <u>et al.</u> , 1983.	A
14. Cobden <u>et al.</u> , 1979 y 1980	D
15. Juby <u>et al.</u> , 1987	D
16. Shippee <u>et al.</u> , 1992	A
17. Murphy <u>et al.</u> , 1989.	A
18. Fleming <u>et al.</u> , 1990.	C
19. Elia <u>et al.</u> , 1987.	B

Métodos

- A Derivación trimetilsilil/ Cromatografía de gases.
- B Enzimático
- C HPLC
- D Peryódico

comparaciones interindividuales. Si pueden pasar sustancias normalmente no absorbidas o poco absorbidas cuando hay mayor permeabilidad, también pueden pasar los carcinógenos y otras sustancias extrañas que pueden provocar tumores u otras enfermedades (Shiau y Chang, 1986).

Según Cassidy et al. (1990), con dietas altas en fibra dietética, la fibra puede tener una influencia sobre la producción de, e interactuar con, la mucina de la mucosa intestinal, creando una barrera a la absorción de nutrimentos y afectando la permeabilidad del intestino delgado.

Bjarnason (1988) encontró una permeabilidad intestinal alta en los trópicos, la cual se normalizó cuando la persona pasó a vivir a otro país con una dieta diferente, lo que indica que la dieta tiene algo que ver con la permeabilidad intestinal, un resultado que se refleja en el estudio de Sullivan (1992) en Gambia y el de Lindenbaum et al. (1972) en Bangladesh.

La deficiencia de hierro causa una permeabilidad anormal (Juby et al., 1989); finalmente, los ácidos biliares pueden aumentar la permeabilidad intestinal, pero el salvado reduce la cantidad de estos ácidos en el intestino (Shiau y Chang, 1986).

9) Métodos para medir la permeabilidad intestinal.

En algunos estudios anteriores, se hicieron biopsias del intestino delgado para verificar su estado y, comparándolo con tejidos sanos, para informar sobre los posibles cambios de absorción y permeabilidad (Tasman-Jones et al., 1978; Brown et al., 1979;

Cassidy et al., 1981; Cassidy et al., 1982; Jacobs, 1983; Jacobs y White, 1983; Jacobs y Lupton, 1984; Sigleo et al., 1984; Vahouny et al., 1985; Paulini et al., 1987 en animales; Lindenbaum et al., 1972; Schenk et al., 1972; Sullivan et al., 1991 en humanos). Los resultados ya se mencionaron en la sección I-6 en la parte sobre los cambios morfológicos encontrados con la ingestión de altas cantidades de fibra dietética. Además, se hicieron estudios con un sólo azúcar (Corcoran y Page, 1943; Laker y Mount, 1980; Behrens et al., 1984; Bjarnason et al., 1988; Lunn et al., 1989; Northrop et al., 1990) o con otra sustancia (Sundqvist et al., 1980), a veces con marcador radioactivo (Elia et al., 1987).

El método más común, sin embargo, para medir la permeabilidad es el de dos azúcares, una técnica no invasiva y no radioactiva de estimar los aspectos específicos de la función e integridad de la mucosa del intestino delgado (Cobden et al., 1979, 1980 y 1985; Laker, 1979; Isolauri et al., 1989; Murphy et al., 1989; Barau y Dupont, 1990; Dupont y Goutail-Flaud, 1990; Harris et al., 1992; Shippee et al., 1992; Cooper y Ukabam, 1984; Haldorsen, 1977; Menzies et al., 1979, Cobden et al., 1979, 1980 y 1985; Ford et al., 1985; Juby et al., 1987; Leclercq-Foucart et al., 1987; Gomes et al., 1983; Behrens et al., 1987; Elia et al., 1987; Juby et al., 1989; Harris et al., 1991; Lunn et al., 1991; Sullivan et al., 1992; Delahunty y Hollander, 1986; Nathavitharana et al., 1988; Fleming et al., 1990; Willems et al., 1993). El método está basado en la administración de 2 tipos de azúcar, un monosacárido y un disacárido, no metabolizables en el cuerpo, de manera que la

excreción renal puede utilizarse para medir su absorción intestinal. En realidad, el manitol es un hexitol, no una hexosa, pero por razones de conveniencia se considera como azúcar en esta tesis. Se miden posteriormente las cantidades de estos azúcares en la orina (Hamilton et al., 1987), y una relación baja de disacárido/ monosacárido (ej. lactulosa/manitol) en la orina indica una mucosa normal, mientras que se observan valores elevados en casos de un cambio en las capacidades de absorción de moléculas de diferentes tamaños.

En esta prueba se emplean diferentes azúcares, y combinaciones de ellos, cada uno con sus ventajas y sus desventajas. La combinación más utilizada es de lactulosa/manitol (Laker, 1979; Behrens et al., 1984 y 1987; Elia et al., 1987; Juby et al., 1987; Nathavitharana et al., 1988; Isolauri et al., 1989; Murphy et al., 1989; Barau y Dupont, 1990; Dupont y Goutail-Flaud, 1990; Fleming et al., 1990; Lunn et al., 1991; Harris et al., 1992; Shippee et al., 1992; Sullivan et al., 1992; Willems et al., 1993; Cooper y Ukabam, 1984). En los estudios de Harris et al. (1992) y Sullivan et al. (1992), se aplicó la solución de la lactulosa y el manitol por vía naso-gástrica, en los otros casos por vía oral. La lactulosa, de PM 342, (Fig. 5a) no se hidroliza en el intestino (Juby et al., 1987) y en el caso del manitol (PM 182 - Fig. 5b), aun que sí hay algo de oxidación en el hígado, ésta no afecta los resultados de la prueba de permeabilidad intestinal porque se utiliza menos de 1% del manitol ingerido (Elia et al., 1987; Nathavitharana et al., 1988). Los azúcares salen en picos separados en la cromatografía

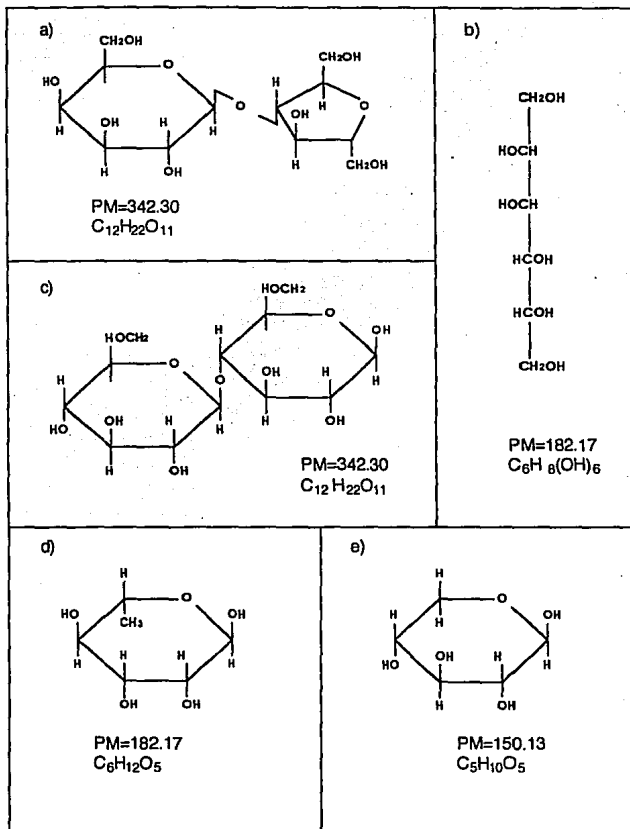


Figura 5: Fórmulas químicas:
a) la lactulosa; b) el manitol; c) la celobiossa;
d) la ramnosa; e) la xilosa.

de líquidos por alta presión (HPLC), y no hay interferencia entre ellos, ni entre ellos y otros azúcares posiblemente presentes en la orina. En algunos estudios (Anónimo, 1985; Delahunty y Hollander, 1986; Gomes et al., 1983) se utilizaron la lactulosa y el manitol juntos con otro azúcar similar al manitol, la ramnosa de PM 164 (Fig. 5d). El inconveniente de la ramnosa es el retraso en su excreción en la orina debido a una posible reabsorción parcial en los riñones. La ramnosa también se utilizó a solas con la lactulosa (Ford et al., 1985; Murphy et al., 1989). Otra combinación que se utilizó es la de la celobiosa con el manitol. La celobiosa (Fig. 5c), parecida en su tamaño (PM 342.2) a la lactulosa, cuesta menos, pero presenta la desventaja que se hidroliza parcialmente por la lactasa del intestino delgado (Cobden et al., 1979, 1980 y 1985; Juby et al., 1987 y 1989). Ya no se utiliza la xilosa (PM 151.12) (Fig. 5e) porque tiene la desventaja de que su absorción se realiza en parte por difusión facilitada (Menzies et al., 1979; Cobden et al., 1980; Nathavitharana et al., 1988), y porque la diferencia en función renal y en el tiempo del tránsito intestinal entre sujetos afecta su excreción (Anónimo, 1985). Otras sustancias que no son hidratos de carbono que se han utilizado son el ácido etilendiaminatetracético marcado con ⁵¹Cromo (⁵¹Cr-EDTA; PM 340) y el polietilenglicol de PM 400 (PEG 400) (Elia et al., 1987; Bjarnason et al., 1988; Sundqvist et al., 1990). El primero es radioactivo, así que su uso no es conveniente en casos de pruebas repetidas. También el ⁵¹Cr-EDTA se afecta por la ingestión de fármacos y de alcohol (Bjarnason et al., 1984). El

PEG 400, que tiene las ventajas de no ser tóxico, no metabolizarse y de tener una excreción rápida, tiene el inconveniente que hay diferencias de peso molecular entre los lotes producidos y su absorción depende de su peso molecular (Sundqvist et al., 1980). Además, Bjarnason et al. (1984) informan que el PEG tiene propiedades lipofílicas, lo que implica una absorción, en parte por lo menos, directamente por las microvellosidades, en lugar de por los poros acuosos. Esto significaría una fuente de error en los resultados de una prueba que pretende medir los cambios de la permeabilidad de la mucosa intestinal a las moléculas puramente hidrofílicas.

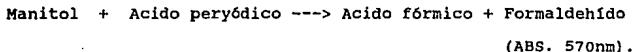
En estos estudios, se informaron algunas diferencias en la osmolaridad de las soluciones administradas; en unos estudios (ver Tablas 2 y 3 para las referencias) se aplicó una solución hiperosmolar para aumentar la cantidad de las moléculas de mayor peso molecular en las muestras de orina. No hubo cambios en la cantidad de las moléculas de menor peso molecular (Nathavitharana et al., 1988). Se prepara una solución hiperosmolar con la adición de agentes absorbibles para aumentar la presión osmótica (Anónimo, 1985). Este agente puede ser la lactosa, la sacarosa o el glicerol; desafortunadamente, la lactosa no se digiere bien, la sacarosa en una solución hiperosmolar puede causar diarrea osmótica, y el glicerol de una solución hipertónica se absorbe muy rápidamente en el yeyuno, lo que disminuye el efecto deseado de que pase a la orina una mayor cantidad de disacáridos. Por otro lado, en otros estudios (ver Tablas 2 y 3 para las referencias) se

utilizó una solución iso-osmolar para evitar el riesgo de la diarrea osmótica causada por soluciones hiperosmolares. La utilización de soluciones de diferentes osmolaridades hace más difícil la comparación entre los métodos utilizados.

Además, se informaron diferentes métodos para medir la concentración de las sustancias utilizadas en las muestras de orina. Estos métodos presentan ventajas y desventajas, las cuales se mencionan a continuación:

a) Método de oxidación del manitol con ácido peryódico (Corcoran y Page, 1943; Cobden et al., 1979, 1980 y 1985).

Se puede resumir este método con la siguiente ecuación:



Es un método donde la reacción ocurre a temperatura ambiente. Sin embargo, con cualquier cambio en esta temperatura, cambia también la densidad óptica del resultado. Tampoco es muy específico como método, porque otras sustancias pueden convertirse en formaldehído, lo que daría una medición equivocada. También hay riesgo de equivocaciones en el caso de la presencia de altas cantidades de glucosa, lo que puede ocurrir en los casos de que las muestras se obtengan de individuos enfermos.

b) Contador de rayos gama; detector de centelleo (Elia et al., 1987).

Se leen las emisiones de radioactividad de una muestra de orina con un contador de rayos gama y un detector de centelleo. Es un método rápido, preciso, sensible y específico de medir la cantidad de ⁵¹Cr-EDTA en muestras de orina. La mayor desventaja es que es un método que involucra determinación de radioactividad y, por lo tanto, no se recomienda en casos de pruebas repetidas o en niños.

c) La medición con cromatografía de gases (Laker, 1979; Laker y Mount, 1980; Sundqvist et al., 1980; Isolauri et al., 1989; Murphy et al., 1989; Barau y Dupont, 1990; Dupont y Goutail-Flaud, 1990; Harris et al., 1992; Shippee et al., 1992; Cooper y Ukabam, 1984). Se utilizan varios reactivos para formar un derivado el cual puede inyectarse directamente en la columna de cromatografía; los reactivos pueden ser (piridina/bis(trimetilsilil) acetamida/trimetilclorosilano (piridina-BSA-TMCS), piridina/hexametildisilazano trimetilclorosilano (piridina-HMDS-TMCS), o piridina/bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (piridina-BSTFA). También se pueden preparar derivados metilados y acetilados. Con este método, el cual es más preciso y sensible, se pueden medir varias sustancias a la vez, y no se necesita una desalinización previa. Sin embargo, es un método lento (aprox. 3 muestras/h), que involucra muchos pasos de preparación lo que puede causar más errores en las mediciones, y además varios cambios de temperatura para poder medir cada azúcar debidamente. Con piridina-HMDS-TMCS,

se forma un precipitado de cloruro de amonio que ensucia la columna. Con piridina-BSA-TMCS, esto no pasa, pero sí hay formación de derivados múltiples, formas anoméricas de los azúcares reductores que dan picos múltiples en el cromatograma. Las derivaciones por metilación son muy laboriosas; por acetilación, los derivados no son muy volátiles así que el tiempo de retención es muy lento.

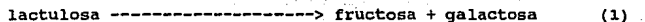
d) Cromatografía de capa fina (o cromatografía en papel), seguida por densitometría (Haldorsen, 1977; Menzies et al., 1979, Cobden et al., 1979, 1980 y 1985; Ford et al., 1985; Juby et al., 1987; Leclercq-Foucart et al., 1987; Bjarnason et al., 1988; Gomes et al., 1983).

Las muestras se aplican a placas cubiertas de sílica-gel u otra sustancia, o a tiras de papel absorbente. Los componentes se separan por la acción capilar de un soluto; se identifican los componentes con un reactivo y se hace la medición con densitometría de barrido. Las dos preparaciones (de capa fina y en papel) son métodos sensibles y precisos, pero son poco específicos. El método de cromatografía de papel es muy lento, y el de capa fina tiene el problema de que el color del revelado se desvanece con el tiempo.

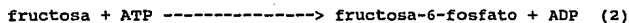
e) Método enzimático (Behrens et al., 1984 y 1987; Elia et al., 1987; Juby et al., 1989; Lunn et al., 1989; Northrop et al., 1990; Harris et al., 1991; Lunn et al., 1991; Sullivan et al., 1992).

Los pasos de las reacciones involucradas en la aplicación de este método se resumen de la siguiente forma (Lactulosa, ecuaciones 1-4: Manitol, ecuación 5)

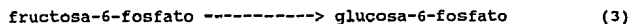
beta-galactosidasa



hexocinasa



fosfogluco

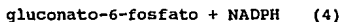


isomerasa

glucosa-6-fosfato



deshidrogenasa



(ABS. 340nm)

manitol deshidrogenasa

<-----



Con este método, no se requiere preparación previa de las muestras lo cual causa menos errores; el método es específico porque las enzimas utilizadas son específicas para sus sustratos, y es muy rápida. Este método puede aplicarse con el equipo automatizado COBAS BIO (Roche Diagnostic Systems, Suiza). Sin embargo, no se pueden medir al mismo tiempo los componentes interesantes al estudio. Además, tanto el equipo como la enzima manitol deshidrogenasa (EC.1.1.1.67) utilizada para la medición del manitol no se pueden adquirir fácilmente. Según Shippee (1992), cuando la enzima no está disponible comercialmente, se puede preparar, purificar y estandarizar siguiendo el método de Yamanaka (1975). La enzima aparece en el Catálogo Sigma (M9532), pero con un precio prohibitivo si se trata de muchas muestras. Por último, algunos pacientes, sobre todo los quemados o con trauma, presentan un azúcar en la orina el cual puede interferir con esta técnica ya que es el mismo azúcar (fructosa) que aparece en el paso 1 del desarrollo del sustrato medido al final de la técnica. Estos pacientes pueden dar resultados falsos positivos.

f) Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) (Delahunty y Hollander, 1986; Nathavitharana et al., 1988; Fleming et al., 1990; Willems et al., 1993).

Después de preparar, purificar y desalinizar la muestra, se inyecta una cantidad conocida de 2 a 50 microlitros de la muestra en una columna (de intercambio aniónico, de intercambio catiónico o de análisis de hidratos de carbono) y se cuantifican los azúcares por

un detector (de índice de refracción, de masas, o pulso amperométrico). Hamilton et al. (1987) no desalinizaron sus muestras, porque se perdió una parte del disacárido, el cual aparece en cantidades pequeñas en la orina. Se pueden medir al mismo tiempo todos los azúcares utilizados en el estudio; es un método rápido, sensible y específico. La desventaja de los detectores de pulso amperométrico y de masas es su poca disponibilidad. El detector de índice de refracción es una buena opción si se combina con una columna que no necesite calentamiento, lo que no es el caso de las columnas de intercambio aniónico o catiónico. Este detector es muy sensible a cambios de temperatura.

Un resumen de los métodos, con sus ventajas y desventajas correspondientes, aparece en la Tabla 4.

En todos los estudios mencionados hubo desacuerdo sobre el problema de las muestras en ayunas; algunos ni siquiera mencionan si las tomaron o no. Algunos sí la tomaron solamente para desecharla, como método de vaciar la vejiga de los sujetos. Otros tomaron una muestra y su medición sirvió como línea de base para las mediciones después de haber ingerido la solución de azúcares. Por último, algunos desecharon la muestra porque encontraron cantidades elevadas de los azúcares del estudio, pero esto no concuerda con los hallazgos de Laker y Mount (1980), Juby et al. (1989), Barau y Dupont (1990), y Dupont y Goutail-Flaud (1990), quienes afirman que sí hay una producción endógena, pero en cantidades tan bajas que no

METODO	SUSTANCIA MEDIDA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Acido peryódico	Manitol	Temperatura ambiente	El color depende de la temperatura. No específico.
Contador de rayos gama y detector de centelleo.	⁵¹ Cr-EDTA	Rápido, preciso, sensible, específico.	Radioactivo.
Cromatografía de gases con o sin derivación trimetilalilil	Disacáridos PEG	No se necesita desalminización. Mediciones múltiples Preciso, sensible.	Las formas anoméricas dan picos múltiples. Lento, muchos pasos. Temperatura diferente para cada sustancia. El derivado ensucia la columna. No cuantitativo. Estorbo (metilización) Tiempo de retención largo (acetilación)
Cromatografía de capa fina (CF) o de papel.	Disacáridos	Preciso, sensible.	No específico. Lento. Color inestable (CF).

Tabla 4: Resumen de las ventajas y las desventajas más importantes de los métodos utilizados para medir la permeabilidad de la mucosa intestinal

(continuación)

(continuación)

METODO	SUSTANCIA MEDIDA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Enzimático (COBAS BIO)	Disacáridos	No necesita preparación de la muestra. Rápido (automático). Específico al sustrato.	Equipo especializado Enzima no disponible comercialmente. Interferencia en casos de enfermos (esp. quemados)
HPLC Detectores Amperométrico (A) Índice de refracción (IR) Masa (M)	Disacáridos	Preciso, sensible. Específico, rápido. Mediciones múltiples simultáneas.	Afectado por la temperatura (IR)

Tabla 4: Resumen de las ventajas y las desventajas más importantes de los métodos utilizados para medir la permeabilidad de la mucosa intestinal

afectarían los resultados de los estudios.

Este último detalle, aunado con la gran variedad de sustancias utilizadas y de métodos empleados en los estudios, hace muy difícil la comparación entre los trabajos llevados a cabo en este campo. En las Tablas 2 y 3 se pueden apreciar los promedios de los porcentajes de la lactulosa y del manitol recuperados y la relación de lactulosa/manitol informados en los estudios que utilizaron la lactulosa o el manitol para medir la permeabilidad de la mucosa intestinal. Hay datos para adultos y niños sanos, además de los resultados de adultos y niños que padecían diferentes enfermedades. A pesar de la variedad de métodos utilizados, lo que dificulta una comparación válida entre estudios, se puede apreciar que, en términos generales, hay una relación de lactulosa/manitol mayor cuando se trata de sujetos con enfermedades intestinales comparados con sujetos sanos, aunque en el caso de las vellosidades atróficas la diferencia no es muy notoria (ver sección I-8). Cuando hay daño a la mucosa intestinal, se supone que la recuperación de la lactulosa en la orina será mayor y la del manitol menor que las recuperaciones de estas sustancias en sujetos sanos (ver sección I-7); esto no está respaldado por los datos de los estudios que utilizaron una solución iso-osmolar. El intervalo de los valores del porcentaje de la lactulosa recuperada en sujetos enfermos y sanos fue de 0.06 a 0.53 y de 0.79 a 1.17 respectivamente, aunque en el caso de alergias los valores son mayores que en sujetos sanos (1.46-2.5%). El intervalo de los valores del porcentaje del manitol recuperado en sujetos enfermos fue de 10.9 a 21.6%, y en

individuos sanos de 1.1 a 4.3%, pero en el caso de alergias la disminución no fue tan notoria (6.0-16.3%). Por otro lado, se ve mucho mejor este efecto en los estudios que utilizaron una solución hiperosmolar. Los intervalos de valores de recuperación informados para sujetos enfermos y sanos fueron respectivamente: 0.2-4.9% y 0.091-0.62% para la lactulosa; 0.97% ó 0.424-2.9% y 10.18-11.12% ó 16.9-32.09% para el manitol, según el método utilizado (ver Tablas 2 y 3 para las referencias). De estos estudios, los únicos que pueden compararse fueron los estudios de niños con diarrea ya que emplearon el mismo método de medición (Referencias 2 y 8 de las Tablas 2 y 3) aunque un estudio utilizó una solución iso-osmolar y el otro una solución hiperosmolar. El valor de la relación de lactulosa/manitol está mucho más elevado en el estudio utilizando la solución hiperosmolar (0.01-0.48 iso-osmolar y 13.19 hiperosmolar). Desafortunadamente, faltan datos preliminares que podrían indicar la fuente de este aumento, el cual podría ser debido a una reducción en el porcentaje del manitol recuperado, o a un aumento en el porcentaje de la lactulosa recuperada.

II. OBJETIVOS.

1. Establecer la metodología para medir la relación de lactulosa/manitol en la orina mediante el uso de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) con detector de índice de refracción, y utilizar esta medición como indicador de la permeabilidad intestinal.

2. Evaluar el efecto de la ingestión de la dieta rural mexicana en la permeabilidad de la mucosa intestinal en individuos sanos.

III. MATERIALES Y METODOS.

1. Establecimiento de la técnica para medir la permeabilidad intestinal.

Se utilizó el método de HPLC (ver sección III-2d) con detector de índice de refracción para medir las cantidades de la lactulosa y del manitol en la orina, usando la muestra en ayunas como línea de base para las mediciones. Aunque este método es un poco más complicado que otros (ver sección I-9), debido a que las muestras requieren una preparación previa, es más específico y sensible, no necesita calentamiento de la columna y puede medir los dos compuestos a la vez. No hubo interferencia entre la lactulosa y el manitol, ni entre ellos y otros azúcares utilizados en las mediciones por HPLC en otros estudios (Laker, 1979; Laker, 1980; Cobden, 1985; Delahunty y Hollander, 1986; Elia *et al.*, 1987; Northrup, 1990); tampoco hubo en otros estudios evidencia de alguna sustancia inhibidora en la orina que pudiera afectar a los azúcares utilizados en las pruebas (Behrens, 1984; Northrup, 1990). Se decidió administrar la lactulosa y el manitol en una solución iso-osmolar para evitar el riesgo de diarrea osmótica.

a) Estandarización.

Se corrieron estándares de manitol y lactulosa disueltos por separado en el eluyente y se hizo una curva patrón para cada

azúcar.

b) Recuperación

Después de los pasos de preparación, purificación y liofilización (ver sección III-2d más adelante), se hicieron pruebas de recuperación con una muestra de orina con cantidades conocidas de lactulosa y manitol adicionadas para cuantificar las pérdidas debidas a la preparación de la muestra y para verificar la recuperación uniforme entre las corridas (reproducibilidad). Se inyectó la misma muestra trece veces a distintas concentraciones para cumplir lo recomendado para este tipo de pruebas (Dong et al., 1992). La recuperación de lactulosa y manitol fue baja como puede observarse en la sección IV-3b de los resultados, por lo que los resultados se expresaron como la relación entre los dos azúcares, evitando con ello la complicación de las posibles pérdidas en la preparación la cual afecta a ambos azúcares de la misma manera (Lifschitz, 1985). Este razonamiento también es válida en los casos de los errores debidos a los factores ajenos a la mucosa, tales como el tiempo de tránsito intestinal, el vaciamiento gástrico, la función renal, la función hepática, la motilidad intestinal, y las colecciones incompletas (Cobden, 1979; Cobden, 1985; Anónimo, 1985; Juby et al., 1987; Juby et al., 1989; Harris et al., 1992). Respecto a este último punto, no es necesario entonces medir ni creatinina, ni otro marcador urinario (ej. PABA) los cuales se usan para verificar que las colecciones sean completas en estudios que utilizan muestras de orina (Bingham, 1985).

c) Problemas en la técnica original y las modificaciones a la técnica.

Se encontraron los siguientes problemas en los primeros intentos de medir la lactulosa y el manitol en las muestras de orina.

i) Los azúcares, sobre todo la lactulosa, están en concentraciones muy bajas en las muestras. Los valores más bajos informados (Behrens et al., 1984; Lunn et al., 1991) de recuperación en la orina en estudios con sujetos sanos son:

Para la lactulosa - 0.34%

Para el manitol - 0.42%

Para superar este problema se liofilizó la muestra para aumentar su concentración. Se usó una liofilizadora marca Virtis Research Equipment (Gardner, New York. W.H. Curtin y Compañía); se congeló la muestra líquida en un baño de acetona comercial y CO₂ sólido. Luego se rehidrató el producto con un volumen pequeño de eluyente, el cual estuvo formado por 72.5% de acetonitrilo grado HPLC y 27.5% de agua desionizada. Con esto, la muestra aumentó su concentración 25 veces. Además, se utilizó una asa de 100 microlitros en el equipo de HPLC en lugar del asa más común de 20 microlitros, lo cual equivale a que se concentrara la muestra 5 veces.

ii) Debido a que se tapó la columna con las sustancias todavía presentes en la muestra aún después de la preparación y la purificación que ya se describieron, fue necesario utilizar un sistema de Swinney de 13mm, el cual realiza una microfiltración con una membrana de 0.5 micrometros resistente al acetonitrilo (Waters, Millipore Corporation, Milford, Estados Unidos) para filtrar las

muestras antes de inyectarlas.

2) Evaluación del efecto de la ingestión de una dieta rural mexicana en la permeabilidad de la mucosa intestinal.

(Figura 6).

a) **Sujetos**

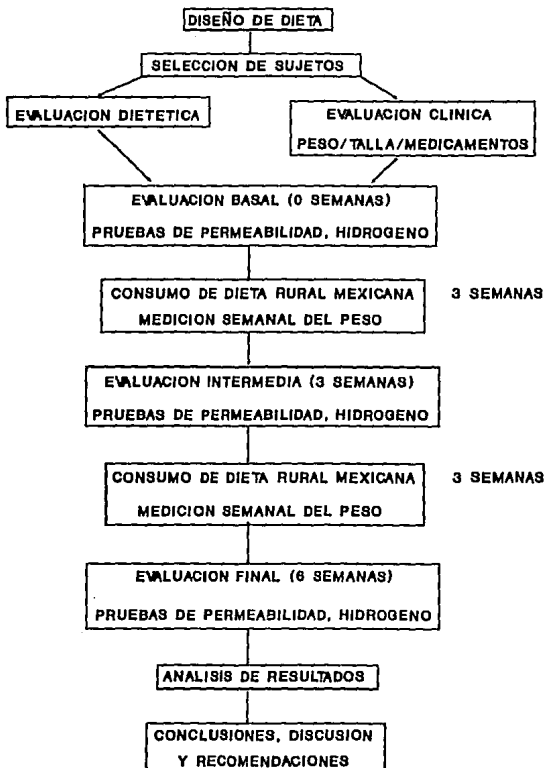
Se seleccionaron 9 voluntarias sanas que no presentaran ninguna enfermedad gastrointestinal evidente y que no estuvieron bajo tratamiento con medicamentos. Las 9 voluntarias se seleccionaron de entre las trabajadoras del Instituto Nacional de la Nutrición, lo que facilitó la administración de la dieta y la toma de muestras. La edad de las voluntarias fue entre los 24 y 41 años, con un promedio de 33.44 ± 5.77 años. A todas se les describió el protocolo y se les solicitó su consentimiento por escrito. Se les explicó en forma detallada los posibles riesgos y complicaciones del estudio, además de las pruebas a efectuar. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Investigación en Humanos del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ).

b) **Evaluación basal.**

A cada mujer se le aplicó una encuesta para conocer su dieta habitual mediante registro de alimentos de 24 horas durante 7 días y una relación de frecuencia semanal de consumo de alimentos (ver Anexo 1a y 1b). En el caso del registro de alimentos de 24 horas, las voluntarias tenían que anotar en la forma más detallada cada alimento que ingirieran durante el día, con las cantidades

Figura 6.

DIAGRAMA DE FLUJO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL
DEL ESTUDIO PILOTO



aproximadas de los alimentos consumidos. En el caso de la frecuencia semanal de consumo de alimentos, las voluntarias tenían que informar la frecuencia semanal del consumo de cada alimento en la lista además de evaluar aproximadamente la cantidad ingerida cada vez que lo consumía. El dato de la frecuencia tenía las siguientes opciones: nunca, rara vez, y de 1 a 7 veces a la semana. La evaluación de estas encuestas formó la base para la selección de las 9 voluntarias más adecuados para la prueba. Se incluyeron en el estudio únicamente las mujeres que consumían en forma habitual menos de 20g/d de fibra dietética. Se tomó este valor de manera arbitraria para evitar la inclusión en el estudio de voluntarias que consumieran dietas altas en fibra dietética. Por este método, se pudo remarcar una gran diferencia entre la dieta habitual de los sujetos (menos de 20g de FDT/día) y la dieta del estudio (un promedio de 51.7 ± 3.3 g de FDT/día).

Antes de administrar la dieta se tomaron el peso y la talla de cada sujeto para los siguientes fines:

a) Para calcular la superficie corporal de cada sujeto de la cual dependen las dosis de la lactulosa y el manitol en agua que las voluntarias tomaron como parte de las pruebas a las 0, 3 y 6 semanas posteriores a la administración de la dieta experimental. Con el peso y la talla inicial, se calculó la superficie corporal con la fórmula de Dubois (Dubois, D. y Dubois, E.F. 1916):

$$SC (m^2) = PESO^{0.425} (kg) \times TALLA^{0.725} (cm) \times 0.007184$$

La concentración de la lactulosa en agua fue de 75g/L (Lactulose Syrup USP 10g/15ml. Goldline Laboratories, Fort Lauderdale) y la del manitol de 10g/L (Droguería Cosmopolita S.A. de C.V.). La dosis de la mezcla fue de 10ml de solución para cada 0.10 m² de superficie corporal.

b) Para estimar el requerimiento energético de mantenimiento.

Se utilizaron las tablas de FAO/WHO/UNU, 1985 y Beal, 1983 para calcular teóricamente la energía de mantenimiento promedio necesaria para sujetos con las características de las voluntarias (edad, peso, talla).

Además, se tomó el peso de las voluntarias el mismo día de cada semana durante la administración de la dieta para verificar que la dieta contuviera la energía de mantenimiento necesaria.

Se verificó también el consumo de medicamentos de las voluntarias, por ejemplo antibióticos, laxantes, y complementos de fibra. No se investigó ni el uso de anticonceptivos orales ni la presencia de parásitos en las voluntarias; ambos son factores crónicos por lo que su presencia sería constante durante todo el período del estudio.

c) **Formulación de la dieta.**

Una licenciada en Nutrición del departamento de Fisiología de la Nutrición, diseñó 7 menús distintos uno para cada día de la semana. Esto permitió introducir variedad y facilitar la aceptación de la dieta. La dieta se basó en el suministro de un mínimo de 50g/d de fibra dietética, tomando como base los

ingredientes de la dieta del estudio de Rosado et al (1992) (Tabla 1) pero calculando la fibra dietética total (Rosado et al., 1993); la dieta proporcionó aproximadamente 1600 kcal/d. Los siete menús elaborados se describen en el Anexo 2. La dieta se administró durante 6 semanas. El desayuno y la comida se sirvieron en la Unidad Metabólica del Instituto Nacional de la Nutrición; la cena y los alimentos para el fin de semana se entregaron ya empaquetados para que las voluntarias los comieran en su casa. Las voluntarias consumieron una cantidad de alimentos mínima para cubrir las características antes mencionadas, pudiendo consumir más en caso de que se quedaran con hambre. Además, las voluntarias informaron la cantidad de azúcar tomado en el día en café, té etc. Cuando quedaba algo de los alimentos empacados, las voluntarias lo regresaban al departamento al día siguiente, o después del fin de semana, para cuantificarlo. Los nutrimentos de la comida adicional que consumieron se sumaron, y los nutrimentos de la comida no consumida se restaron, obteniéndose de esta forma el total de nutrimentos consumidos por cada sujeto. Para cuantificar el contenido de nutrimentos de cada menú, además del cálculo teórico con tablas, se realizaron análisis químicos proximales en un duplicado de cada menú. Un duplicado consistió en una muestra de los alimentos consumidos en 24 horas por cada sujeto.

Hubo dos períodos de la administración de la dieta: el primer período duró desde el 29 de septiembre de 1992 hasta el 10 de noviembre de 1992 e incluyó a 4 voluntarias; el segundo empezó el 10 de febrero de 1993 y terminó el 24 de marzo del mismo año, esta

vez con 5 voluntarias. Al final de los experimentos hubo 14 duplicados, 7 del primer período y 7 del segundo, los cuales se analizaron por separado, promediándose los resultados de los duplicados del mismo día de los dos períodos.

El primer paso de la preparación de la muestra fue una homogeneización en un molino coloidal (Probst y Class, N/60/S, Alemania Federal), seguido por desecación en una estufa a 70°C (Robertshaw, Pensilvania, PA 15697, Estados Unidos) durante 18 horas. Para tener una muestra bien homogeneizada se molió la materia seca en un molino (Compañía Arthur H. Thomas, Filadelfia, PA, Estados Unidos). Se realizaron los siguientes análisis químicos proximales en una muestra de cada menú (ver Anexo 3 para los detalles):

- i) Fibra dietética por el método oficial AOAC (Prosky, 1984 y 1985).
- ii) Energía con una bomba calorimétrica (Parr Instruments Co.Inc., Moline, Illinois, Estados Unidos)
- iii) Proteína por el método de Kjeldahl automatizado (Kjeltec System, Dinamarca).
- iv) Grasa por el método de Soxhlet (Tecator: Soxtec System, HT.).
- v) Calcio, zinc, hierro y magnesio por espectrofotometría de absorción atómica (Perkins-Elmer, Modelo 2380).
- vi) Humedad por desecación en una estufa (Robertshaw, Pensilvania, PA 15697, Estados Unidos) a 70°C.

vii) Cenizas en una mufla (Thermolyne, Dubuque IV, Dubuque, Iowa, Estados Unidos) a 550°C.

viii) Hidratos de carbono por diferencia.

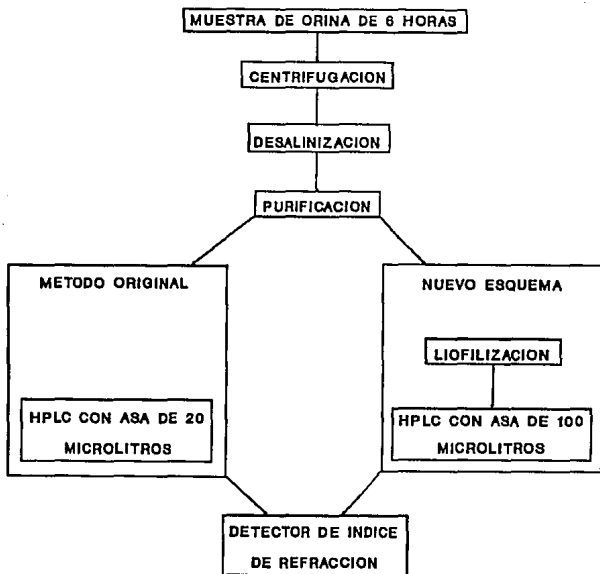
d) Valoración de la permeabilidad intestinal.

Se realizó una prueba de la permeabilidad intestinal a las 0, 3 y 6 semanas después de la administración de la dieta, mediante una modificación del método informado por Nathavitharana (1988). Después de un ayuno de 11 a 12 horas, se colectó una muestra de orina de cada sujeto (especimen en ayunas). Esto permitió vaciar completamente la vejiga y obtener el valor basal de cada sujeto. Posteriormente se administró a cada sujeto una solución de 75g/L de lactulosa y 10g/L de manitol diluidos en agua (una solución iso-osmolar de 359 mOsm/kg, medida con un equipo Advanced Digimatic Modelo 3D2, Estados Unidos); la dosis administrada fue de 100ml por metro cuadrado de superficie corporal (Nathavitharana, 1988). Al final de una hora, el sujeto bebió toda el agua que podía para incrementar el flujo de la orina, pero no se permitieron otras bebidas ni alimentos hasta terminar la prueba. Se colectó la orina durante las siguientes 6 horas ya que los hidratos de carbono utilizados como marcadores se excretan en la orina durante este período, los excedentes pasan al intestino grueso donde la fermentación por bacterias colónicas impide más que se absorban (Elia et al, 1987). El promedio de la duración de colección de orina en otros estudios fue de 5 a 6 horas. Las muestras de orina, tanto en ayunas como de las 6 horas después de ingerir la solución

de lactulosa y manitol en agua, se guardaron en botellas que contenían 5ml de tolueno como conservador, y se conservaron en congelación a -12°C hasta el día de los análisis. Las muestras se conservaron un máximo de 32 semanas en congelación, un período que es aceptable para que no exista modificaciones de los azúcares en la orina (Menzies, 1973; Menzies, 1979; Ford, 1985).

Las muestras de orina (Figura 7) se centrifugaron (Garver Electrífuge Modelo 55 a 3,000 RPM durante 20 minutos) para quitar cualquier depósito y luego se desalinizaron con Amberlita MB-1 (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., Estados Unidos). La Amberlita se preparó de la siguiente manera (Comunicación: enero 1994, Sigma Chemical Company, Inglaterra): se llenan unas columnas cromatográficas (300 x 20mm diámetro) con 0.5g de Amberlita MB-1 para cada mililitro de orina a desalinizar; se cubre la Amberlita MB-1 con agua desionizada y se deja reposar durante 15 minutos. Después de escurrir el agua de la columna, se pasa bastante buffer de fosfatos de pH 6.98 (60% Na_2HPO_4 0.067M; 40% KH_2PO_4 0.067M: Sorenson, 1909) para cubrir la Amberlita MB-1 y se deja reposar el material durante 15 minutos. Se escurre otra vez el líquido de la columna, se deja pasar aproximadamente 10ml de la muestra de orina y la Amberlita MB-1 ya está listo para desalinizar la muestra. La orina desalinizada se purificó pasándola por cartuchos de extracción de fase sólida "Seppak" C-18 (Waters). El cartucho es un Cartucho Clásico, de cuerpo corto, tamaño del poro de 125A, tamaño de la partícula de 55-105 micrometros y la fórmula del contenido del cartucho es $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ C_{18} H_{37} . Los cartuchos se

Figura 7.
DIAGRAMA DE FLUJO PARA LAS MEDICIONES
DE LACTULOSA Y MANITOL EN LA ORINA

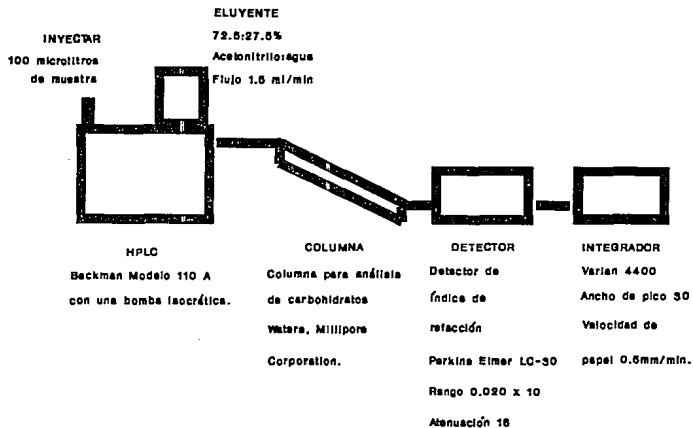


prepararon de la siguiente manera: se inyecta lentamente 2.5ml de metanol por el cartucho y se deja reposar por lo menos durante 3 minutos. Después se lava el cartucho inyectando 7ml de agua desionizada y los cartuchos están listos para la filtración. Se midió la relación de lactulosa:manitol en la orina mediante HPLC (Cromatografía de líquidos de alta presión; Figura 8 para los detalles). Se utilizó una columna con grupos amino de 3.9mm x 30cm. de acero inoxidable (Waters, Millipore Corporation, Milford, Estados Unidos). El eluyente fue una solución de 72.5% de acetonitrilo grado HPLC y 27.5% de agua desionizada (v/v) filtrada y desgasificada. La atenuación fue de 16, el rango de 0.020×10^3 y el flujo de 1.5ml/min. Se pasaron los solutos eluidos por un detector de índice de refracción y se compararon los resultados con mezclas patrones de lactulosa y manitol disueltos en el mismo eluyente. Los resultados se expresaron como la relación de concentraciones de lactulosa/manitol en cada muestra.

e) Evaluación de la fermentación colónica.

Bajo condiciones apropiadas de pH, ciertas especies de la flora bacteriana del tracto intestinal humano pueden fermentar hidratos de carbono dando como productos los ácidos grasos de cadena corta, metano, bióxido de carbono e hidrógeno. Aproximadamente de 14 a 21% del hidrógeno producido durante la fermentación pasa a la circulación y es excretado por los pulmones (Gearheart et al., 1976). Después de la ingestión de una solución de dos azúcares no absorbidos, un aumento en la excreción de hidrógeno en el aire

Figura 8: Esquema del equipo de medición con HPLC (Cromatografía de líquidos a alta presión).



espirado indica el inicio de la fermentación de estos hidratos de carbono en la parte proximal del colon, es decir la prueba es un indicador para medir el tiempo del tránsito intestinal (Bond y Levitt, 1972; Christman y Hamilton, 1982) el cual, en este caso incluye el tiempo de tránsito de la boca al colon.

La determinación de hidrógeno en una muestra de aire espirado está basada en la técnica de cromatografía de gases (Bond, 1975; Kotler, 1982; Rosado et al, 1984; Rosado, 1985); es decir, se hace pasar la mezcla de gases contenida en una muestra de aire espirado a través de la columna, la cual separa los diferentes gases componentes mediante adsorción diferencial (Fig. 9). Es recomendable encender el equipo por lo menos 5 horas antes de la prueba para que se estabilice. Una vez que se ha calibrado el aparato (Quintron Micro Lyzer, Modelo 12) con un gas de referencia de concentración conocida, la concentración de hidrógeno de la muestra en cuestión se mide en forma directa y rápida mediante extrapolación con el gas de referencia, y puede leerse directamente en un panel digital en partes por millón. El equipo necesita calibración cada 30 a 60 minutos cuando se están leyendo las muestras porque tiende a variar (Rosado y Solomons, 1984).

Se midió la fermentación colónica después de la administración de lactulosa y manitol a las 0, 3 y 6 semanas posteriores a la administración de la dieta experimental. Se obtuvo una muestra de aire espirado por la boca mediante una válvula de una salida conectada a una bolsa de hule. Se tomó una muestra de aire espirado en ayunas para conocer el valor basal de cada sujeto, y

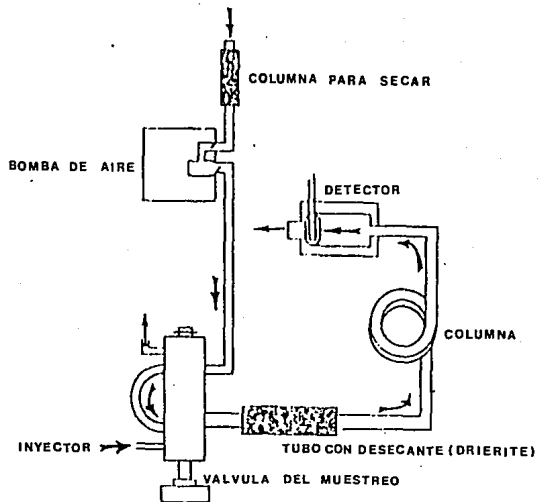


Fig. 9: Esquema del flujo por el equipo Quintron MicroLyzer. (Christman y Hamilton, 1982).

luego se tomaron muestras cada diez minutos durante las primeras dos horas después de la ingestión de la solución de los dos azúcares, y posteriormente cada media hora hasta terminar las seis horas de la prueba. Debido a que el hidrógeno es el más difusible de los gases, las muestras deben ser transferidas a sistemas herméticos en donde pueden almacenarse desde su obtención hasta su análisis el mismo día (Solomons et al., 1977). La muestra contenida en la bolsa de hule fue transferida a jeringas de plástico de 20 ml con válvula de tres vías, las cuales son adecuadas para periodos de 12 a 24 horas sin pérdida significativa de hidrógeno (Rosado y Solomons, 1983). La pérdida para jeringas de plástico es de aproximadamente 5% por día. En la aplicación de este sistema se debe considerar un efecto de dilución constante de aproximadamente 30% en la concentración de hidrógeno debido al espacio muerto existente en el árbol traqueobronquial (Solomons, 1977). El análisis de hidrógeno en el aire espirado es un sistema práctico porque permite a los sujetos realizar sus actividades normales durante la prueba.

Posteriormente, se calculó para cada sujeto el área bajo la curva con la siguiente ecuación, ajustada para la temperatura ambiente y la altitud de la ciudad de México (Solomons et al., 1977):

$$\frac{(T_0 - T_0) + (T_1 - T_0)}{2} + \frac{(T_1 - T_0) + (T_2 - T_0)}{2} \dots$$

$$\dots + \frac{(T_{n-1} - T_0) + (T_n - T_0)}{2} \text{ ppm.h}$$

donde T_0 = la concentración basal de H_2 en ppm, T_1 = la concentración de H_2 en ppm al final del primer intervalo, T_2 = la concentración de H_2 en ppm al final del segundo intervalo, T_{n-1} = la concentración de H_2 en ppm al final del penúltimo intervalo, T_n = la concentración de H_2 en ppm al final del último intervalo.

El resultado se obtiene en unidades arbitrarias de ppm.h Se puede considerar esta medida como el volumen de hidrógeno excretado durante las seis horas de observación. Con este cálculo, se tiene un indicador de los dos azúcares que no se absorbieron y que llegaron al colon donde fueron fermentados. Los resultados del tiempo de tránsito y del volumen de hidrógeno espirado tienen variaciones grandes entre sujetos pero sirven para poder hacer comparaciones intraindividuales, es decir cada sujeto como su mismo control (Welsh *et al.*, 1981; Kotler *et al.*, 1982; Dreher, 1987).

3. Estadística.

Para saber si existe un efecto de la ingestión de la dieta rural en la permeabilidad intestinal y en la fermentación colónica, se realizaron análisis de varianza, por cuadrado latino y por un diseño en bloques respectivamente, utilizando el programa de estadística SPSS (SPSS/PC, SPSS Inc., Chicago, 1988). Para todos los casos se utilizaron los datos obtenidos de la evaluación basal, intermedia y final (0, 3 y 6 semanas). Para la permeabilidad intestinal se comparó la relación de los porcentajes recuperados de lactulosa y manitol en la orina. En el caso de la fermentación colónica, se comparó el tiempo de tránsito de los azúcares

administrados y el volumen del hidrógeno espirado.

Todos los resultados mostraron homogeneidad con la prueba de Bartlett-Box, así que se hicieron los análisis sin transformar los datos (Box et al., 1987). Se hizo una prueba de eficiencia relativa en el caso de los resultados de las relaciones de lactulosa/manitol en la orina, y se encontró que fue más eficiente el cuadrado latino con repeticiones (Daniel, 1991).

Se hicieron pruebas de Spearman Rank también en los casos siguientes:

- a) la comparación de la relación de lactulosa/manitol y el tiempo de tránsito para cada sujeto a las 0, 3 y 6 semanas.
- b) la comparación de la relación de lactulosa/manitol y el volumen de hidrógeno espirado para cada sujeto a las 0, 3 y 6 semanas.
- c) la comparación de las concentraciones de la lactulosa y del manitol recuperadas en la orina para cada sujeto a las 0, 3 y 6 semanas.

Además, se hizo una prueba de t de Student entre el peso inicial y peso final de las voluntarias para comprobar que la energía de la dieta era adecuada para el mantenimiento de las voluntarias.

IV. RESULTADOS.

1. Características de las voluntarias.

En la Tabla 5 aparecen los datos antropométricos de las voluntarias tomados antes de la administración de la dieta. Con estos datos se calculó la superficie corporal con la ecuación de Dubois (ver sección III-2b), lo que se utilizó para fijar la dosis de los dos

azúcares para cada sujeto. También se verificó que la dieta de aproximadamente 1600 kcal al día aportara la energía de mantenimiento para las voluntarias. El peso promedio \pm DE de las voluntarias fue de 57.56 ± 9.61 kg, y la talla promedio de 155 ± 3.5 cm. De la información en las fuentes citadas al final de la tabla, se calculó que las mujeres entre los 24 y los 41 años necesitan de 1600 a 2400 kcal al día (FAO/WHO/UNU, 1985; Beal, 1983). La dieta suministró alrededor de 1600 kcal/día, pero las voluntarias tuvieron la posibilidad de consumir más en el caso de que se quedaran con hambre; si se consumiera algo, se registró el valor energético de la comida extra.

Se analizó la información proporcionada en los registros de 24 horas para calcular la ingestión habitual de fibra dietética total por día. En ninguno de los casos el promedio pasó la cantidad crítica del estudio de 20 g/día (Tabla 6).

De esta forma se aseguró un cambio fuerte entre la cantidad de fibra dietética ingerida en la dieta habitual de las voluntarias (de tipo urbano) y el contenido de aproximadamente 50g/día de fibra dietética total de la dieta (de tipo rural).

2. Contenido de nutrimentos de la dieta experimental.

El contenido de nutrimentos de los menús se determinó tomando información a partir cuatro fuentes: del programa de computadora Food Processor II. Esha Research, 1990; de las tablas del Instituto Nacional de la Nutrición (1977 y 1992) y del artículo de Rosado et al (1993). Posteriormente, se hicieron los análisis químicos

Tabla 5.

Peso y talla inicial para calcular la energía de mantenimiento teórica de las voluntarias.

VOLUNTARIA	PESO INICIAL (KG)	TALLA (CM)
1	48	148
2	56	157
3	47	155
4	47	154
5	71	156
6	70	155
7	66	160
8	59	158
9	54	152
PROMEDIO ± DE	57.56 ± 9.61	155 ± 3.5

Con tablas, se calculó que las mujeres entre los 23 y los 50 años, con un peso promedio de 55kg y un talla de 163cm necesitan de 1600 a 2400 kcal al día.

FUENTES: FAO/WHO/UNU. Protein and Energy Requirements. Ginebra. 1985.

Beal, V.A. Nutrición en el ciclo de la vida. Limusa. México. 1983.

Tabla 6

Ingestión media diaria de fibras totales* en la dieta habitual de las voluntarias basada en los recordatorios de 24 horas (g).

VOLUNTARIA	INGESTION MEDIA DE FIBRA
1	6.84
2	8.67
3	10.30
4	6.61
5	13.77
6	14.83
7	19.79
8	12.11
9	12.43

* Calculados de las tablas de Rosado et al., 1993.

proximales del contenido de todos los duplicados de la dieta del estudio. El resumen de esta información aparece en la Tabla 7. El valor experimental de la FDT se asemeja más al valor calculado de Rosado et al., (1993); los valores experimentales de energía, grasa, hidratos de carbono, Ca y Mg tienden a acercarse a los valores del programa de computadora Food Processor II; el valor para proteínas está muy por debajo tanto del valor de Food Processor II como del valor calculado de las tablas del Instituto de la Nutrición; finalmente los valores de Zn y Fe están muy por arriba de los valores teóricos.

La Tabla 8 muestra el peso inicial y el peso final de cada sujeto.

El valor de t calculado (2.18) es menor que la t de tablas (2.306; $p > 0.05$), así que hay que aceptar la hipótesis nula de que no hay diferencia entre los valores de peso inicial y peso final y por lo tanto la energía de la dieta debió ser suficiente para mantenimiento. De este modo se confirmó que la dieta permitió el mantenimiento de las voluntarias del estudio, porque no hubo ni aumento ni pérdida del peso corporal.

3. Pruebas de permeabilidad intestinal.

a) Estandarización.

Las dos curvas patrón, de la lactulosa y del manitol, son lineales para los límites de las mediciones experimentales. El coeficiente de regresión de la concentración de la lactulosa con el área bajo la curva de los picos en HPLC es de 0.999916 para la lactulosa, y para el manitol, 0.99995 (Figuras 10 y 11).

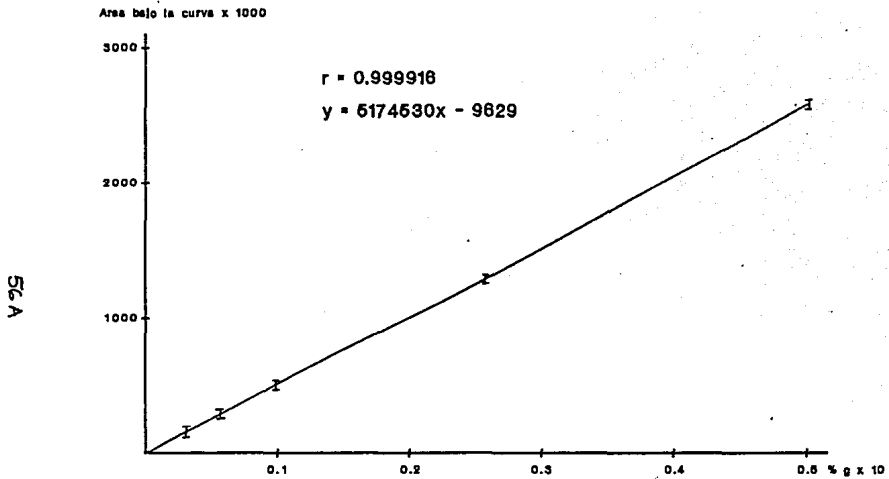


Fig.10: Curva patrón de la lactulosa.

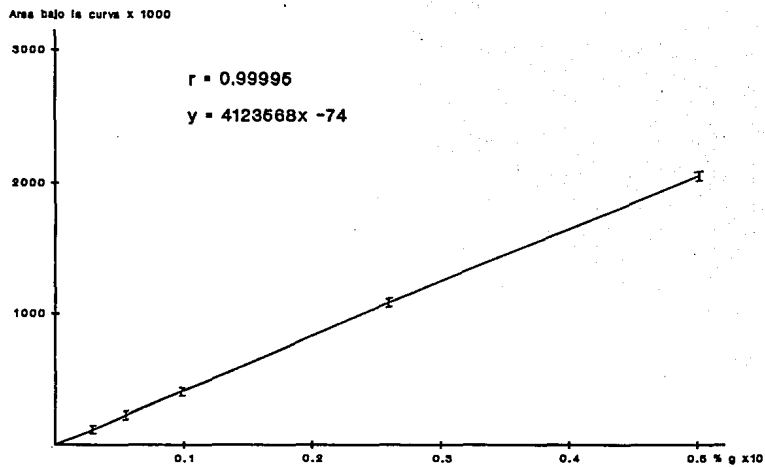


Fig.11: Curva patrón del manitol.

Tabla 7.

Valores teóricos provenientes de varias fuentes y valores experimentales de los duplicados de los 7 menús elaborados para los dos períodos de la administración de la dieta [promedios base húmeda/día (\pm DE); n=14].

ANALISIS	TABLAS 1 ¹	TABLAS 2 ²	TABLAS 3 ³	EXPERI- MENTAL	CV % EXPT ⁴
FDT ⁵ (g/100g)	2.65 (0.11)	-	2.27 (0.20)	2.02 (0.23)	11.39
E (kcal)	1604.7 (200.9)	1622.5 (121.5)	-	1544.7 (208.8)	13.52
PROTEINA (g)	64.0 (5.3)	86.11 (9.41)	-	49.4 (5.2)	10.53
GRASA ⁶ (g)	37.8 (10.3)	29.39 (6.81)	-	34.1 (9.3)	27.27
CENIZA (g/100g)	-	-	-	6.33 (0.61)	9.65
HUMEDAD (g/100g)	-	-	-	85.26 (1.23)	1.44
SOLIDOS TOTALES (g/100g)	-	-	-	14.75 (1.23)	8.35

(continuación)

Fe (mg)	23.0 (4.7)	50.04 (13.93)	-	82.99 (15.25)	18.38
Mg (mg)	594.6 (47.6)	* 598.10 (80.00)	-	594.6 (185.7)	1.25
Zn (mg)	7.47 (0.74)	* 10.31 (1.86)	-	98.80 (27.90)	28.24
Ca (mg)	1183.8 (73.3)	1699.2 (103.4)	-	829.2 (136.6)	16.47
CHO ⁷ (g)	280.0 (25.9)	428.28 (44.65)	-	231.7 (58.4)	25.21

Cifras entre paréntesis = desviación estándar.

1 Food Processor II. Esha Research. 1990.

2 Instituto Nacional de la Nutrición 1977.

* Instituto Nacional de la Nutrición 1992.

3 Rosado et al. 1993.

4 $\%CV = \frac{DE}{\text{valor}} \times 100$
x experimental

5 FDT = Fibra Dietética Total

6 Grasa, valores teóricos; no incluyen la grasa u otro nutriente utilizado en la preparación.

7 Hidratos de carbono (resultados experimentales) por diferencia.

Tabla 8.

Cálculo del cambio de peso durante la dieta para verificar si la dieta aportó suficiente energía para el mantenimiento.

VOLUNTARIA	PESO INICIAL (kg)	PESO FINAL (kg)	CAMBIO (kg)
1	48.00	46.40	-1.60
2	56.00	56.06	+0.06
3	47.00	47.66	+0,66
4	47.00	46.25	-0.75
5	71.00	65.60	-5.40
6	70.00	69.00	-1.00
7	66.00	64.10	-1.90
8	59.00	56.60	-2.40
9	54.00	54.30	+0.30

Prueba t de Student para las muestras pareadas.

$$t_1 (0.05) = 2.306$$

$$t_{\text{calc}} = 2.18 \text{ NS}$$

b) Recuperación.

Después de los pasos de preparación, purificación y liofilización, se hicieron pruebas de recuperación con una muestra de orina con la adición de cantidades conocidas de lactulosa y manitol para cuantificar las pérdidas debidas a la preparación de la muestra y para verificar que la recuperación fue similar entre las corridas. Los promedios de los porcentajes de recuperación obtenidos fueron:

Lactulosa $71.63 \pm 1.43\%$ CV = 2.00%

Manitol $70.57 \pm 3.36\%$ CV = 4.76%

Los porcentajes de recuperación de la lactulosa y del manitol fueron bajos como fueron los CV respectivos: es decir que, aunque se perdió cierta cantidad de azúcares en la preparación, no hubo mucha variación entre las corridas. Como se explicó antes (ver sección III-1b), expresando los resultados como la relación de los dos azúcares se evita el problema de las posibles pérdidas en la preparación, porque los dos azúcares se ven afectados de la misma manera.

c) Mediciones.

En las Tablas 9, 10 y 11 se pueden apreciar los resultados de las mediciones de permeabilidad intestinal. Se midieron los azúcares en la orina como el porcentaje de la dosis administrada. El promedio de los porcentajes de la dosis administrada de la lactulosa presente en la orina antes de la administración de la dieta fue de $0.030 \pm 0.032\%$; en la evaluación intermedia, de $0.024 \pm 0.021\%$; y a las 6 semanas, la valoración final, de $0.006 \pm$

0.009%. En el caso del manitol, los promedios respectivos fueron $1.460 \pm 0.979\%$, $0.734 \pm 0.647\%$ y $0.367 \pm 1.381\%$. En cuanto a las relaciones lactulosa/manitol, los datos de las 0, 3 y 6 semanas fueron como siguen: 0.023 ± 0.029 , 0.029 ± 0.027 y 0.014 ± 0.019 . Al final de la tabla 12 aparece el análisis de varianza que se hizo para comparar los resultados de la relación de lactulosa/manitol a las 0, 3 y 6 semanas. Hubo una diferencia altamente significativa en los resultados entre voluntarias ($p < 0.01$) y entre períodos ($p < 0.01$). Los resultados de los estudios anteriores también mostraron grandes variaciones entre voluntarias, debido a factores hereditarios y ambientales. Se puede apreciar esta variación, además, en las desviaciones estándar grandes de los porcentajes de lactulosa y manitol recuperados en la orina y de las relaciones de lactulosa/manitol. En cuanto a la diferencia altamente significativa entre períodos, se hizo posteriormente una prueba de rango múltiple de Duncan al nivel de significancia de 0.05, el cual mostró que hubo una diferencia significativa entre los resultados de las 3 semanas y los de las 0 y 6 semanas. No hubo diferencia significativa entre los resultados de las 0 y 6 semanas. La gráfica de las relaciones de lactulosa/manitol en la orina a las 0, 3 y 6 semanas (Fig. 12) muestra mejor el valor mayor a las tres semanas seguido de una disminución a las 6 semanas a un valor similar al de las 0 semanas. Esto indica que hubo un aumento en la permeabilidad de la mucosa intestinal a las tres semanas, seguido de un regreso a un estado normal a las 6 semanas. No hubo diferencia significativa en la categoría de repeticiones, lo que

Tabla 9.

Mediciones de los porcentajes recuperados de lactulosa y manitol y su relación a las 0 semanas. (Medición basal).

VOLUN- TARIA	LACTULOSA	MANITOL	RELACION LACTULOSA/MANITOL
1	0.015	1.367	0.011
2	0.005	0.827	0.006
3	0.000	0.000	0.000
4	0.012	1.290	0.010
5	0.106	2.806	0.038
6	0.023	2.909	0.008
7	0.043	2.005	0.021
8	0.049	0.516	0.095
9	0.023	1.422	0.016
\bar{x}	0.030	1.460	0.023
\pm DE	0.032	0.979	0.029

Tabla 10.

Mediciones de los porcentajes recuperados de lactulosa y manitol y su relación a las 3 semanas. (Medición intermedia).

VOLUN- TARIA	LACTULOSA	MANITOL	RELACION LACTULOSA/MANITOL
1	0.006	0.066	0.085
2	0.013	1.524	0.009
3	0.005	0.399	0.013
4	0.030	1.799	0.017
5	0.022	1.109	0.020
6	0.066	0.000	0.000
7	0.050	0.987	0.051
8	0.020	0.389	0.051
9	0.006	0.326	0.017
\bar{x}	0.024	0.734	0.029
\pm DE	0.021	0.647	0.027

Tabla 11.

Mediciones de los porcentajes de lactulosa y manitol y su relación a las 6 semanas. (Medición final).

VOLUN- TARIA	LACTULOSA	MANITOL	RELACION LACTULOSA/MANITOL
1	0.006	0.269	0.022
2	0.003	0.256	0.010
3	0.023	2.172	0.011
4	0.012	2.900	0.004
5	0.004	0.302	0.013
6	-0.008	-0.975	0.000
7	0.008	-1.454	0.000
8	0.002	0.028	0.061
9	0.000	-0.195	0.000
\bar{x}	0.006	0.367	0.014
\pm DE	0.009	1.381	0.020

Tabla 12.

Análisis por cuadrado latino de las relaciones de lactulosa/mantitol de los 3 períodos experimentales (0, 3 y 6 semanas).

VOL.	0 SEMANAS	3 SEMANAS	6 SEMANAS
1	0.011	0.085	0.022
2	0.006	0.009	0.010
3	0.000	0.013	0.011
4	0.010	0.017	0.004
5	0.038	0.020	0.013
6	0.008	0.000	0.000
7	0.021	0.051	0.000
8	0.095	0.051	0.061
9	0.016	0.017	0.000
\bar{x}	0.023	0.029	0.014
\pm DE	0.029	0.027	0.019

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F calc.
Voluntaria	8	28.352	3.544	13.953 **
Período	2	2.563	1.282	5.047 **
Repeticiones	3	0.203	0.068	0.268 NS
Error	61	15.462	0.254	
Total	74	48.150		

** p < 0.01 NS = no significativo

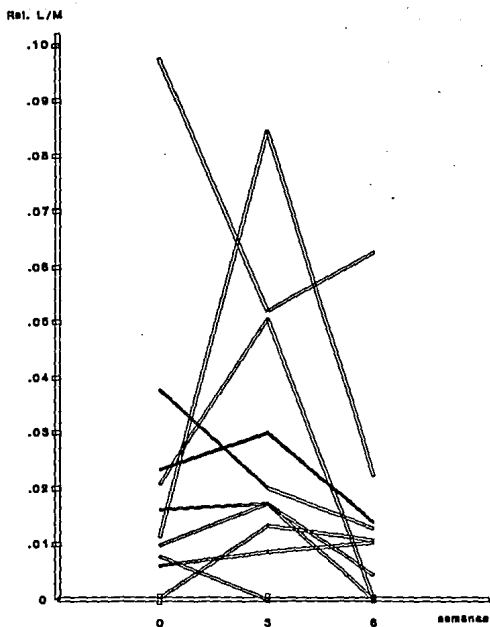


Fig.12: Las relaciones de lactulosa/
manitol de cada individuo y los
promedios de todas las relaciones
a las 0, 3 y 6 semanas (— = promedios)

indica que las repeticiones que se hicieron fueron suficientes.

4. Pruebas de fermentación colónica.

En un análisis de varianza con los datos de los tiempos de tránsito de los dos azúcares en el aparato digestivo, la F calculada fue de 0.3962; no hubo diferencia significativa entre los resultados de 0, 3 y 6 semanas (Tabla 13).

En el análisis de varianza de los volúmenes de hidrógeno espirado (Tabla 14), no hubo diferencia significativa (F calculada de 0.3646) entre los 3 periodos.

5. Asociaciones entre los resultados de las pruebas de la permeabilidad intestinal y las de la fermentación colónica.

No se encontró asociación entre los pares de datos de tiempo de tránsito/lactulosa:manitol y volumen de hidrógeno/lactulosa:manitol (Figs. 13 y 14). Los valores de r_s calculado respectivos para estos casos fueron: -0.1653 y -0.0568. Los valores de r_s de tablas en cada caso son 0.392 ($p < 0.05$) y 0.515 ($p < 0.01$), GL 26. En estos dos casos, la r_s calculada $< r_s$ de tablas, comparando el valor absoluto de los resultados con los valores de tablas, así que se acepta la hipótesis nula de que no hay asociación entre los grupos de resultados.

Sin embargo, en la prueba de asociación entre la concentración de la lactulosa y la del manitol en la orina (Figura 15), el valor de r_s calculado (0.5438) $> r_s$ de tablas (0.515; $p < 0.01$) indicando una asociación positiva entre estas concentraciones. A mayores

Tabla 13.

Resultados de la comparación entre los tiempos de tránsito (t-t)¹ a las 0, 3 y 6 semanas.

SUJETO	0 SEMANAS t-t de boca al colon (min)	3 SEMANAS t-t de boca al colon (min)	6 SEMANAS t-t de boca al colon (min)
1	50	50	50
2	60	70	80
3	50	140	80
4	60	50	70
5	60	40	100
6	50	70	60
7	110	60	90
8	40	80	50
9	100	80	90
$\bar{x} \pm DE$	64.4 \pm 24	71.1 \pm 29	70.0 \pm 18

¹ El tiempo de tránsito se mide por un aumento de más de 20ppm en el hidrógeno espirado arriba del valor basal, tomado antes de ingerir la solución de lactulosa y manitol en agua. Se informa el tiempo después de haber ingerido una solución de lactulosa/manitol cuando ocurrió el aumento. (continúa)

(continuación)

Análisis de varianza.

<u>Fuente</u>	<u>G.L.</u>	<u>S.C.</u>	<u>C.M.</u>	<u>F. calc.</u>
Tratamientos	2	466.67	233.33	0.3962 NS
Error	24	14133.33	588.89	
Total	26	14600.00		

NS = no significativo

Tabla 14.

Resultados de la comparación entre los volúmenes de hidrógeno expirado en las seis horas de la prueba (0, 3 y 6 semanas).

SUJETO	0 SEMANAS	3 SEMANAS	6 SEMANAS
1	392	633.5	550
2	932	846.5	341
3	1166.5	339.5	591
4	540.5	709	320.5
5	376	256.5	229.5
6	771.5	384	759.5
7	441	724.5	750.5
8	1344.5	727.5	1291
9	328	599	659.5
$\bar{x} \pm DE$	699.1 \pm 374	580.0 \pm 204	610.3 \pm 318

Análisis de varianza

<u>Fuente</u>	<u>G.L.</u>	<u>S.C.</u>	<u>C.M.</u>	<u>F. calc.</u>
Tratamientos	2	68987	34493.3	0.3646 NS
Error	24	2270321	94596.7	
Total	26	2339308		

NS = no significativo.

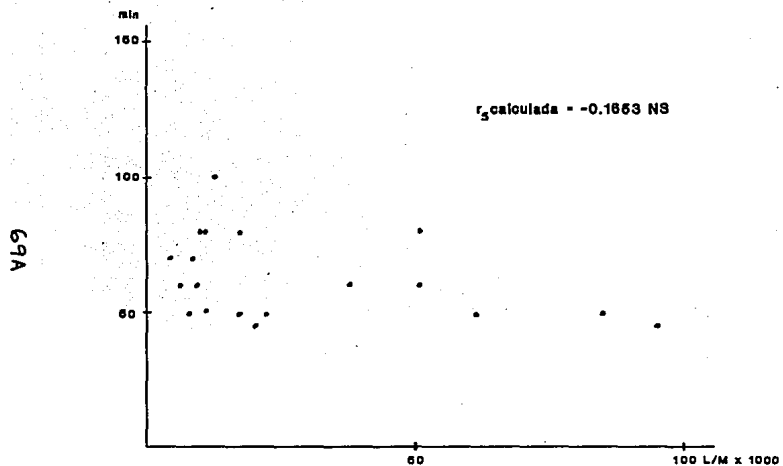


Fig 13 : Asociación entre el tiempo de tránsito (min) y la relación de lactulosa/manitol en la orina a las 0, 3 y 6 semanas.

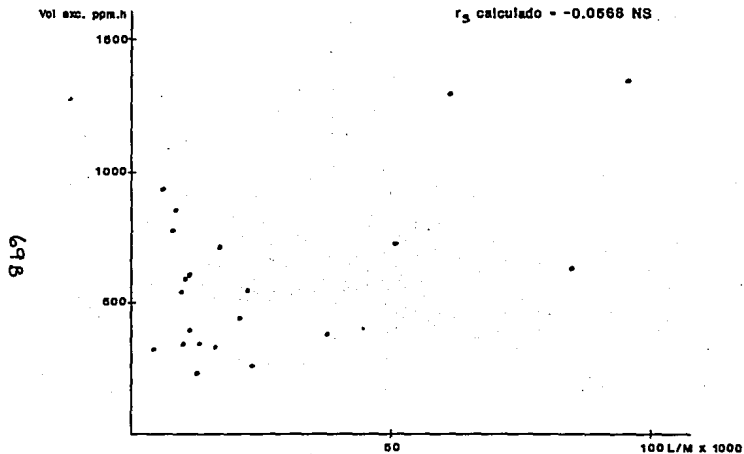


Figura 14: Asociación entre los volúmenes de hidrógeno y las relaciones de lactulosa/manitol a las 0, 3 y 6 semanas.

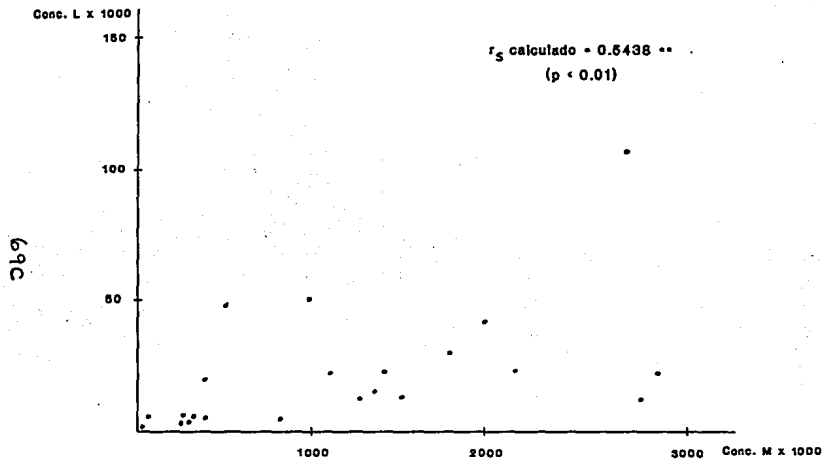


Figura 15: Asociación entre las concentraciones de la lactulosa y del manitol a las 0, 3 y 6 semanas.

recuperaciones de lactulosa en la orina, valores mayores de manitol, y viceversa.

V. DISCUSION.

Se conocen los efectos benéficos y perjudiciales de una dieta alta en fibra (más de 50g/día), como es el modelo de dieta rural mexicana usado (DRM). Esta dieta, por ser rica en alimentos de origen vegetal, contiene otras sustancias que pueden tener un efecto perjudicial en la digestión y absorción de nutrimentos, como son los inhibidores de enzimas, la sílica, los taninos, las saponinas, el ácido fítico, el ácido oxálico y otros. Entre los efectos negativos, se informa una baja en la absorción de nutrimentos cuando se trata de la ingestión de este tipo de dieta (Rosado *et al.*, 1992). Una posibilidad entre las muchas que puedan explicar tal efecto es que haya un daño a la mucosa intestinal, que permita el paso intercelular al plasma de moléculas hidrofílicas de peso molecular elevado normalmente no absorbidas. Esta vía de regreso queda abierta a nutrimentos ya absorbidos; el saldo es una baja aparente en la cantidad de nutrimentos absorbidos.

Se utiliza la prueba de dos azúcares para medir este tipo de cambio en la permeabilidad de la mucosa intestinal. Los azúcares escogidos en el presente estudio la lactulosa (el disacárido) y el manitol (el "monosacárido") son los más comunes en los estudios realizados (ver sección I-9), y evitan muchos de los problemas asociados con otras posibles sustancias. Sin embargo, la lactulosa no absorbida y osmóticamente activa puede cambiar la motilidad

intestinal y acelerar el tránsito de los líquidos. Su acción puede ser de laxante bajo ciertas condiciones de osmolaridad (Holgate y Read, 1983). Este efecto es más evidente cuando se utilizan dosis considerablemente más altas que las utilizadas en el presente estudio.

Los promedios de los porcentajes de lactulosa y manitol recuperados y la relación de lactulosa/manitol informados en otros estudios (Tablas 2 y 3 para datos y referencias) muestran grandes variaciones aun dentro de la misma categoría; sin embargo, en general, hay relaciones mayores de lactulosa/manitol en sujetos que padecen enfermedades intestinales y que tienen una mucosa intestinal dañada, que en sujetos sanos, por ejemplo de 0.046 a 0.67 y de 0.005 a 0.015 en adultos con y sin diarrea respectivamente. También se pueden apreciar los valores mayores de la relación lactulosa/manitol en los estudios que utilizaron una solución hiperosmolar comparados con los estudios donde se utilizó una solución iso-osmolar, por ejemplo de 4.57 a 5.39 y de 0.103 a 0.265 respectivamente en estudios de niños con alérgias. En cuanto al método utilizado para las mediciones en aquellos estudios, en general, las recuperaciones del manitol o de la lactulosa pueden ser mayores o menores pero las relaciones de lactulosa/manitol caen dentro del mismo intervalo en todos los métodos.

En el presente estudio, las relaciones de lactulosa/manitol abarcan el intervalo de 0.000 a 0.095; el valor mayor implica un cierto daño a la mucosa intestinal pero no al mismo grado que los sujetos, por ejemplo, con enfermedad celiaca (0.046-0.67), con diarrea

(0.01-0.48) o con alergias (0.103-0.265). No se había utilizado antes un detector del índice de refracción con una columna de análisis de hidratos de carbono en HPLC para medir los dos azúcares en muestras de orina de adultos sanos después de haber ingerido una solución iso-osmolar de lactulosa/manitol (para evitar el riesgo de la diarrea osmótica), así que no hay comparación directa con los resultados informados en la literatura. El método utilizado aquí es sensible ya que se puede medir hasta 0.001% de recuperación de la dosis administrada; todos los porcentajes leídos de curvas patrón son lineales para el límite de las mediciones experimentales; el método es rápido y puede medir de 4 a 5 corridas de los dos azúcares juntos cada hora y es práctico ya que se miden los dos azúcares al mismo tiempo con la columna a temperatura ambiente. Por otro lado el método presenta algunas desventajas, tales como la necesidad de preparar y liofilizar las muestras antes de analizarlas. La liofilización podría evitarse si se utilizara una solución hiperosmolar. Pasarían a la orina mayores cantidades del disacárido, lo que facilitaría la medición sin concentrar la muestra. Una desventaja de esta alternativa es que no hay resultados uniformes después de la ingestión de una solución hiperosmolar (Lifschitz, 1985). Además, los agentes para aumentar la presión osmótica pueden causar trastornos en el sujeto (lactosa y sacarosa), o absorberse rápidamente (glicerol), disminuyendo de este modo la osmolaridad del contenido intestinal y suprimiendo el efecto de amplificación de la repuesta (Hamilton et al., 1987). Lo ideal sería un agente que aumentara la presión osmótica sin causar

diarrea osmótica.

En cuanto al método por HPLC, el detector del índice de refracción tiene muchas ventajas. Un detector de masas sería más o igualmente sensible, pero por su alto costo no está disponible. Un método con menos preparación previa de la muestra, como es el método enzimático, es más práctico, pero tiene el inconveniente de la medición por separado de los dos azúcares.

El análisis de las relaciones de lactulosa/manitol a las 0, 3 y 6 semanas muestra una diferencia altamente significativa entre los resultados de las 0 y 3 semanas, y las 3 y 6 semanas. No hay diferencia significativa entre los resultados de las 0 y 6 semanas. Esto indica que hubo daño a la mucosa intestinal después de 3 semanas de la administración de la DRM, pero a las 6 semanas hubo una adaptación aparente a la dieta, tomando las relaciones de lactulosa/manitol como indicador. El daño no fue excesivo, sin embargo; se pueden comparar estos valores con los obtenidos en estudios anteriores de sujetos con diarrea, la más leve de las enfermedades intestinales estudiadas. Esta adaptación se semeja mucho a la del estudio de Shiau y Chang (1986), en el que hubo una permeabilidad mayor de la mucosa intestinal de ratas a las 2 semanas, seguida de un retorno al valor original a las 4 semanas. Hubo una adaptación a su dieta de celulosa purificada. Flourié (1992) informó una posible adaptación en la estructura y función del intestino de los animales que afecte a la digestión y absorción de los hidratos de carbono. En otros estudios se encontró una

adaptación en la mucosa intestinal a la absorción reducida de glucosa, mejorando de esta manera la tolerancia del paciente a esta sustancia (Schwartz y Levine, 1980; Jenkins et al., 1990). Gordon et al. (1983) informaron una disminución transitoria en la absorción de nutrimentos la cual fue corregida posteriormente, demostrando la posibilidad de una adaptación a la dieta y a su contenido de fibra dietética. Otra respuesta adaptativa al contenido de fibra es el aumento en el tamaño del páncreas: Flourié (1992) encontró que una dieta alta en fibra administrada durante 4 semanas causó una necesidad mayor de enzimas pancreáticas; la fibra interactúa con las enzimas, bajando de este modo su actividad y el páncreas responde con una producción mayor de enzimas (Flourié, 1992). Finalmente, en un estudio del efecto de la fibra dietética en los minerales, Kelsay (1982) informó la adaptación en adultos sanos a la ingestión de una dieta alta en fibra, mejorándose la disponibilidad de los minerales.

Por otro lado, Reinhold et al. (1975) encontraron que el grado de adaptación del organismo a la ingestión de dietas altas en fibra depende del contenido de ácido fítico de la dieta.

Schneeman (1989) consideró que debería existir una recomendación máxima para la ingestión de la fibra dietética; basándose en los resultados del presente estudio, no sería necesario fijar una cantidad máxima para adultos sanos ya que la dieta rural mexicana promedio, que destaca por su alto contenido de FDT comparada con las dietas habituales de otros países (Bright-See y McKeown-Eyssen, 1984) o con las dietas urbanas de México, no afecta a la

permeabilidad intestinal en el largo plazo. En el presente estudio, tomando los resultados de las relaciones de lactulosa/manitol como indicador, hubo una posible adaptación a una DRM con cantidades muy elevadas de FDT (más de 50g/día). Así, con otras dietas habituales, con aportes menores de FDT, es esperable que se presente una adaptación similar.

Rosado et al. (1992) encontraron que, entre otras consecuencias, la DRM produjo una disminución en la absorción aparente y en el balance de energía, nitrógeno, zinc, hierro y calcio. Hubo resultados similares en un estudio que utilizó alimentos comunmente incluidos en una dieta rural guatemalteca parecida a la DRM (Calloway y Kretsch, 1978). La posible adaptación encontrada en el presente estudio descarta la hipótesis de que una dieta alta en fibra pueda causar cambios en la permeabilidad de la mucosa intestinal que, consecuentemente, afecte la absorción de los nutrimentos en el largo plazo. Sin embargo, existen otros efectos que pueden suceder con la ingestión de una DRM y que tienen este mismo resultado, tales como un cambio en la actividad de las enzimas digestivas, una posible interacción entre la dieta y la mucina de la mucosa intestinal, e interacciones con otros compuestos en la dieta, que quedan por investigar.

Además de la diferencia altamente significativa entre los períodos del estudio, hubo también una diferencia altamente significativa entre las voluntarias. Esto puede explicarse por las posibles diferencias interindividuales como son las hereditarias y ambientales. A nivel racial, Bjarnason et al. (1984) también

encontraron grandes variaciones en los resultados de una prueba de permeabilidad. En su estudio, Nathavitharana et al. (1988) informaron una gran variedad de resultados entre sujetos, pero destacaron la importancia de la validez de las comparaciones intraindividuales y no de las interindividuales. Tampoco hay valores absolutos para las relaciones de lactulosa/manitol en casos de daño a la mucosa intestinal. El sujeto debe ser su mismo control como se aplicó en este estudio.

En cuanto a los resultados de las mediciones de hidrógeno espirado, se puede comentar lo siguiente: primero, que no hubo diferencias entre los tiempos de tránsito de los tres períodos, es decir que no se aceleró ni se retrasó el paso de los nutrimentos de la boca al colon; y segundo, que tampoco hubo diferencias en los volúmenes de hidrógeno espirado. Un efecto informado de la fibra es la acidificación del tracto digestivo que resulta en una actividad reducida de las enzimas intestinales y de las bacterias colónicas que no aguantan los ambientes de pH bajo. Por otro lado, hay informes de una proliferación de las bacterias colónicas con una dieta alta en fibra (ej. la DRM), lo que resultaría en un aumento en la fermentación. En el análisis de los volúmenes de hidrógeno espirado, no hubo diferencia significativa entre los resultados de los tres períodos, aunque existe una tendencia a la baja a las 3 semanas, exactamente cuando hubo un aumento en la relación de lactulosa/manitol en la orina (Tablas 14 y 12). El dato del volumen de hidrógeno espirado refleja la actividad de las bacterias

colónicas en la fermentación de los hidratos de carbono no absorbidos; la implicación de lo anterior puede ser que cuando pasaron mayores cantidades de los azúcares del estudio a la orina, cantidades menores de estos azúcares fueron disponibles para la fermentación por las bacterias colónicas.

En la prueba de asociación entre los tiempos de tránsito y las relaciones de lactulosa/manitol en la orina, tuvo que aceptarse la hipótesis nula de que no hay asociación entre ellos. Gordon et al. (1983) llegaron a la misma conclusión con celobiosa/manitol. Los sujetos que tuvieron un tránsito lento no mostraron valores mayores de lactulosa/manitol, que parece contradictorio ya que el tiempo de contacto con la mucosa intestinal fue mayor.

Tampoco hubo asociación entre los volúmenes de hidrógeno espirado y los valores de lactulosa/manitol en la orina. Las voluntarias que tuvieron menores valores de lactulosa/manitol en la orina no mostraron mayores volúmenes de hidrógeno espirado, lo que sería de esperar si llegan al colon mayores cantidades de azúcares no absorbidos listos para la fermentación bacteriana.

En la prueba de asociación entre las concentraciones de la lactulosa y del manitol, pudo rechazarse la hipótesis nula y afirmar la asociación positiva entre ellos. A mayores concentraciones de lactulosa recuperada en la orina, mayores concentraciones de manitol, y vice versa. Esto no concuerda con la literatura que propone una mayor recuperación de lactulosa y una recuperación menor de manitol si hay daño a la mucosa intestinal.

Las moléculas de bajo peso molecular (c.j. el manitol) se absorben a través de la membrana lipídica por las regiones polares incorporadas en la estructura de la membrana: los poros acuosos (Loehry et al., 1970). Las moléculas hidrofílicas de mayor peso molecular (e.j. la lactulosa) no se difunden por la vía intracelular, sino por una ruta intercelular, entre enterocitos adyacentes, y esto sólo ocasionalmente (Anónimo, 1985). Si hay daño a la mucosa intestinal, la absorción de las moléculas más pequeñas disminuye, porque el daño afecta negativamente la superficie absorbente, y los poros acuosos dejan pasar menos solutos de bajo peso molecular. Al mismo tiempo aumenta la absorción pasiva de moléculas hidrosolubles más grandes, porque el daño afloja la unión entre enterocitos que deja pasar más solutos de mayor peso molecular por estas vías (Menzies, 1979). A las 3 semanas del presente estudio, cuando hubo daño leve a la mucosa intestinal, se disminuyeron las concentraciones recuperadas de ambos azúcares. Sin embargo, la disminución de la lactulosa fue menor que el del manitol, y resultó en una relación más alta de lactulosa/manitol. Parece que se dañaron más los poros acuosos donde pasa normalmente el manitol mientras que el daño a la mucosa no abrió tanto el paso intercelular que habría dejado pasar mayores cantidades de la lactulosa. A las 6 semanas, bajaron aun más las concentraciones de ambos azúcares. Esta vez la disminución fue mayor en la lactulosa que en el manitol, dando como resultado una relación menor de lactulosa/manitol similar a la de las 0 semanas. La posible adaptación de la mucosa intestinal a la DRM hizo que se

cerrara el paso intercelular a la lactulosa aunque los poros acuosos, posiblemente más sensibles al paso del bolo aumentado con fibra, siguieron dañados resultando en una concentración baja de manitol en la orina. Todo lo anterior realza la importancia y utilidad de la prueba de permeabilidad de dos azúcares, y no de uno sólo.

Por último, en la tabla de los valores teóricos y experimentales de los duplicados de los 7 menús de la dieta hubo cierta concordancia entre los valores de FDT en el estudio de Rosado et al. (1993) y los valores experimentales. Para los valores de energía, grasa, hidratos de carbono, Mg y Ca, hubo semejanza entre los valores experimentales y los mostrados en el programa de computadora Food Processor II. En cambio, los valores experimentales elevados de Zn y Fe, comparados con los valores de tablas, pueden atribuirse a una posible contaminación de las muestras durante la medición de estos dos minerales. Sin embargo, las diferentes fuentes de información varían entre sí, demostrando los problemas para medir estos valores con precisión. El bajo valor experimental de proteínas puede ser el resultado de una subestimación del método utilizado, o pérdidas de la muestra durante su preparación.

VI RECOMENDACIONES.

La integridad de la mucosa intestinal es de suma importancia para la salud. Una permeabilidad elevada a los azúcares normalmente no absorbidos indica la posibilidad del paso de sustancias

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

carcinógenas, tóxicas o antigénicas, así que un método de medir los posibles cambios en la permeabilidad intestinal sería de gran ayuda en la investigación y tratamiento de aquellas enfermedades que puedan causar tales problemas. Una desventaja del método utilizado en el presente estudio es la necesidad de liofilizar la muestra para concentrarla antes de su medición. Este paso puede ser innecesario si pasaran a la orina mayores cantidades del disacárido, lo que se puede lograr añadiendo un agente para aumentar la presión osmótica de la solución de azúcares ingerida; los agentes utilizados actualmente causan problemas, especialmente diarrea osmótica, así que la investigación sobre alternativas sería de gran ayuda. El paso de la liofilización puede evitarse también con la utilización de otro método más sensible como el que usa el equipo COBAS BIO.

En cuanto al problema de la baja absorción de nutrimentos con la ingestión de una dieta alta en fibra, como es la DRM, sería preciso continuar con la investigación de la causa de tal disminución. Entre varias posibilidades están los efectos de la dieta rural mexicana en la actividad de las enzimas digestivas, una posible interacción entre la dieta y la mucina de la mucosa intestinal, y las interacciones con otros compuestos de la dieta, por ejemplo el ácido fítico, el ácido oxálico, las saponinas y los taninos.

Una conclusión secundaria de la Tabla 8, aparte de la confirmación de un contenido energético suficiente de la dieta, es que una dieta alta en fibra y baja en grasas y hidratos de carbono simples puede ser de utilidad en el control de peso corporal. Ya existen algunos

trabajos en esta area (Mejía et al., 1989) pero falta mucho que requiere investigarse.

ANEXOS

1) **Anexo 1**

a)

REGISTRO DE ALIMENTOS DE 24 HORAS.

Fecha y nombre _____

DESAYUNO	
COLACION MATUTINA	
COMIDA	
COLACION VESPERTINA	
CENA	
COLACION NOCTURNA	

ALIMENTO	FRECUENCIA	CANT.	ALIMENTO	FRECUENCIA	CANT.
Grupo leche y derivados			grupo cereales y tubérculos		
leche			avena		
yoghurt			tortilla harina		
crema			tortilla maíz		
queso			cereales integrales		
Grupo carne			cereales comerciales		
res			pan de caja (enriquecida)		
pollo			pan de caja integral		
puerco			bolillo		
huevo			pan dulce		
pescado			grasas y aceites		
marlaco			azúcares		
Grupo leguminosae			Misceláneos		
frijol (tipo)			café		
alubias			té		
garbanzo			refrescos		
lentejas			golosinas		
Grupo frutas			frituras comerciales		
anotar cuales			chocolate en polvo		
Grupo verduras			bebidas alcohólicas		
anotar cuales			laxantes		
			suplementos dietéticos		

2) Anexo 2.

Menús basados en el modelo de dieta rural mexicana.

Lunes

Platillo	Ingredientes	Peso g	Fibra g	E kcal
<u>Desayuno</u>				
Sopes verdes	Masa/Minsa	60	2.592	204
	Nopal	90	3.123	20
	Tomate verde	110	1.804	20
	Cebolla	27.5	0.3795	10
	Crema	30	-	90
Frijoles molidos	Frijoles	180	4.372	210
Fruta	Sandía	280	0.952	40
<u>Comida</u>				
Sopa de frijol y elote	Frijoles	180	4.372	210
	Elote	60	2.838	68
Lasaña con Hongos	Pasta	100	0.904	68
	Jitomate	105	1.218	20
	Hongos	115	2.875	20
	Crema	30	-	90

Guisado	Calabacitas	270	4.03	40
de	Jitomate	105	1.218	20
calabacitas	Nopal	90	3.123	20
	Queso	50	-	55
	Chile poblano	22.5	0.902	20
	Cebolla	27.5	0.3795	10

Fruta	Papaya	160	1.872	40
-------	--------	-----	-------	----

Cena

Tamales	Masa/Minsa	100	4.32	340
	Nopales	90	3.123	20
	Chile poblano	22.5	0.902	20
	Jitomate	105	1.218	20
	Cebolla	27.5	0.3795	10

Fruta	Naranja	200	5.86	80
-------	---------	-----	------	----

Martes

Platillo	Ingredientes	Peso g	Fibra g	E kcal
<u>Desayuno</u>				
Chilaquiles	Tortillas	105	5.806	204
rojos	Jitomate	105	1.218	20
	Cebolla	27.5	0.3795	10
	Crema	30	-	90
	Queso	50	-	55
	Chile poblano	22.5	0.902	10
Frijoles	Frijoles	180	4.372	210
Fruta	Sandía	280	0.952	40
<u>Comida</u>				
Mixiotes	Nopal	270	9.369	60
	Jitomate	105	1.218	20
	Cebolla	27.5	0.3795	10
Moros y cristianos	Arroz	30	0.904	68
	Frijoles	180	4.372	210
Tortillas	Tortillas	70	3.87	136
Fruta	Melón	160	0.912	40

Cena

Quesadillas	Tortillas	105	5.806	204
de	Hongos	115	2.875	20
Hongos	Chile poblano	22.5	0.902	10
	Jitomate	52.5	0.609	10
	Cebolla	27.5	0.3795	10
Fruta	Naranja	200	5.86	80

Miercoles

Platillo	Ingredientes	Peso g	Fibra g	E kcal
----------	--------------	--------	---------	--------

Desayuno

Enfrijoladas	Tortillas	105	5.806	204
	Frijoles	270	6.558	315
	Queso panela	25	-	22.5
	Crema	30	-	90

Fruta	Melón	160	0.912	40
-------	-------	-----	-------	----

Comida

Sopa Tolteca	Nopales	90	3.123	20
	Elote	60	2.838	68
	Jitomate	105	1.218	20
	Chile poblano	22.5	0.902	10
	Cebolla	27.5	0.3795	10
	Crema	15	-	45

Espaguetti	Pasta	100	0.904	68
------------	-------	-----	-------	----

al pesto	Albahaca	-	-	-
	Ajo	-	-	-
	Aceite de oliva	10	-	90

Calabacitas	Jitomate	105	1.218	20
-------------	----------	-----	-------	----

gratinadas	Calabacitas	405	6.045	60
	Queso	25	-	22.5

Fruta	Papaya	320	3.744	80
-------	--------	-----	-------	----

Cena

Quesadillas	Tortilla	105	5.806	204
de Nopal	Nopales	180	6.246	40
Navegantes	Huevo	-	-	-
	Jitomate	105	1.218	20
	Cebolla	27.5	0.3795	10
	Chipotle	-	-	-
Frijoles	Frijoles	180	4.372	210
Fruta	Naranja	100	2.93	40

Jueves

Platillo	Ingredientes	Peso g	Fibra g	E kcal
----------	--------------	--------	---------	--------

Desayuno

Sopes a la Mexicana	Masa/Minsa	60	2.592	204
	Frijoles	180	4.375	210
	Jitomate	105	1.218	20
	Cebolla	27.5	0.3795	10
	Crema	30	-	90
	Queso	25	-	22.5

Fruta	Melón	160	0.912	40
-------	-------	-----	-------	----

Comida

Sopa de frijol	Jitomate	105	1.218	20
	Frijoles	180	4.372	210
	Tocino	5	-	30
Espagueti con Hongos	Pasta	100	0.904	68
	Hongos	115	2.875	20
	Crema	30	-	90
	Queso	25	-	22.5
Relleno de jitomate	Jitomates	105	1.218	20
	Cebolla	27.5	0.3795	10
	Nopales	270	9.369	60
	Oregano	-	-	-
Fruta	Papaya	320	3.744	80

Cena

Enchiladas	Tortilla	105	5.806	204
verdes	Tomate verde	110	1.804	20
	Cebolla	27.5	0.3795	10
Ejotes	Ejotes	145	4.55	20
Rojos	Jitomate	210	2.436	40
Fruta	Naranja	100	2.93	40

Viernes

Platillo	Ingredientes	Peso g	Fibra g	E kcal
----------	--------------	--------	---------	--------

Desayuno

Entomatadas	Tortillas	105	5.806	204
	Jitomates	105	1.218	20
	Crema	15	-	45
	Queso	25	-	22.5
	Cebolla	27.5	0.3795	10

Frijoles	Frijoles	180	4.372	210
----------	----------	-----	-------	-----

Fruta	Sandía	280	0.952	40
-------	--------	-----	-------	----

Comida

No que no	Frijol	270	6.558	315
-----------	--------	-----	-------	-----

inolvidable	Chile poblano	180	7.216	80
-------------	---------------	-----	-------	----

	Queso	50	-	55
--	-------	----	---	----

	Chorizo	5	-	90
--	---------	---	---	----

	Crema	15	-	45
--	-------	----	---	----

Tortillas	Tortilla	105	5.805	204
-----------	----------	-----	-------	-----

Fruta	Papaya	160	1.872	40
-------	--------	-----	-------	----

Cena

Coditos	Coditos	100	0.904	68
a la	Elote	30	1.419	34
Mexicana	Calabacita	135	2.015	20
	Chile poblano	22.5	0.902	10
	Jitomate	105	1.218	20
Ejotes	Ejotes	145	4.55	20
a la	Mantequilla	5	-	45
Mantequilla				
Fruta	Naranja	100	2.93	40

Sabado

Platillo	Ingredientes	Peso g	Fibra g	E kcal
----------	--------------	--------	---------	--------

Desayuno

Panuchos de Nopal	Tortilla	105	5.806	204
	Nopal	90	3.123	20
	Frijoles	180	4.372	210
	Cebolla	55	0.759	20

Fruta	Papaya	160	1.872	40
-------	--------	-----	-------	----

Comida

Sopa de Milpa	Elote	60	2.838	68
	Calabacitas	135	2.015	20
	Hongos	57.5	1.438	10
	Chile poblano	45	1.804	20
	Jitomate	105	1.218	20
	Cebolla	27.5	0.3795	10
Ensalada de Nopal	Jitomate	105	1.218	20
	Nopales	180	6.246	40
	Cebolla	27.5	0.3795	10
	Queso	50	-	55

Tortilla	Tortilla	70	3.87	136
----------	----------	----	------	-----

Frijoles	Frijoles	180	4.372	210
----------	----------	-----	-------	-----

Fruta	Naranja	200	5.86	80
-------	---------	-----	------	----

Cena

Espagueti	Pasta	100	0.904	68
rojo	Jitomate	105	1.218	20
	Crema	30	-	90
Ensalada	Lechuga	120	2.436	20
con	Jitomate	105	1.218	20
Ejotes	Ejotes	72.5	2.275	10
Fruta	Melón	160	0.912	40

Domingo

Platillo	Ingredientes	Peso g	Fibra g	E kcal
<u>Desayuno</u>				
Tlacoyos	Masa/Minsa	100	4.32	340
de nopal	Frijoles	90	2.186	105
y frijol	Nopal	90	3.123	20
	Crema	30	-	90
	Jitomate	105	1.218	20
	Cebolla	27.5	0.3795	10
Fruta	Melón	160	0.912	40
<u>Comida</u>				
Crema de calabaza	Calabacitas	135	2.015	20
Arroz blanco	Arroz	30	0.904	68
Nopales	Nopal	270	9.369	60
rellenos	Jitomate	105	1.218	20
	Crema	30	-	90
	Queso	60	-	66
Tortillas	Tortilla	70	3.87	136
Fruta	Melón	160	0.912	40

Cena

Tamales	Frijoles	180	4.372	210
de frijol	Masa/minsa	80	3.456	272
	Calabacita	135	2.015	20
	Chile poblano	22.5	0.902	10
	Cilantro	-	-	-
	Tocino	5	-	30
Fruta	Naranja	200	5.86	80

3) Anexo 3.

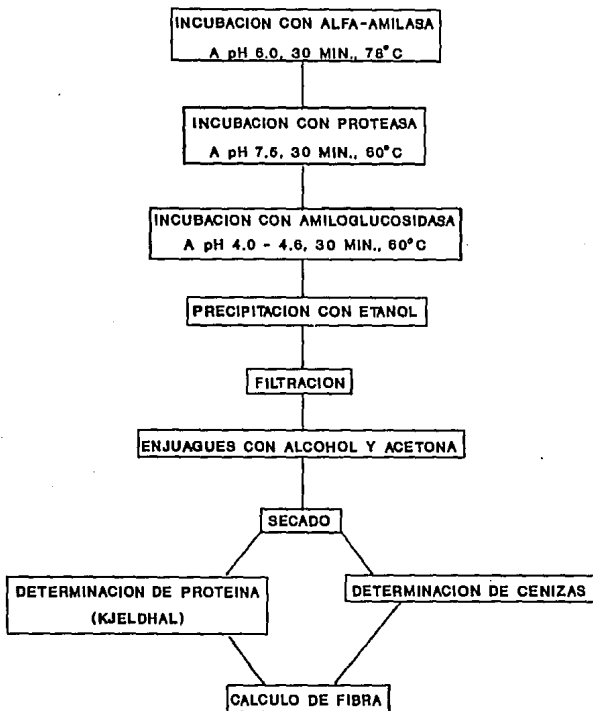
Análisis Químicos Proximales.

1) Fibra dietética total por una modificación del método de Prosky (J Assoc Off Anal Chem, 1984. 67:1044 y J Assoc Off Anal Chem, 1985. 68:399). (Figura 16).

2) Energía en una bomba calorimétrica (Parr Instruments, Co. Inc., Moline, Illinois, Estados Unidos), de acuerdo con el siguiente procedimiento.

- a) Se hace una pastilla de aproximadamente 1g de muestra.
- b) Se pone la muestra dentro de una cápsula y se coloca un alambre previamente pesado entre los electrodos. El alambre de ignición debe hacer contacto con la muestra.
- c) Se adiciona 1ml de agua destilada a la bomba.
- d) Se pone en posición el conjunto de tapa con porta-cápsula, los electrodos, la muestra y el alambre, y se cierra la bomba.
- e) Se llena la bomba con oxígeno a una presión de 32.5 atmósferas.
- f) Se coloca la bomba dentro de la chaqueta del equipo, previamente llenada con 1415 ml de agua destilada con una temperatura mínima de 19°C. Se coloca en su lugar los cables que pasan corriente a los electrodos. Se mide la temperatura con un termómetro colocado dentro del agua de la cuba.
- g) Se deja reposar el conjunto 5 minutos y se apunta la temperatura.
- h) Se deja reposar 5 minutos más, se apunta la temperatura otra vez, y se da ignición a la muestra.

Figura 16.
METODO OFICIAL AOAC PARA MEDIR FDT (PROSKY)



i) Se toma la temperatura cada 30 segundos hasta que ésta empieza a bajar. Se toman 5 minutos más de lecturas a intervalos de 30 segundos cada uno.

j) Se destapa la cuba, se retiran los cables que pasan corriente a los electrodos, y se saca la bomba.

k) Se abre la bomba y se lava cuidadosamente el interior con una solución indicadora de acidez (naranja de metilo). Se titula el lavado con hidróxido de sodio 0.1N.

l) Se quitan los residuos del alambre y se pesan.

m) Se hace el cálculo de energía en la muestra con la siguiente ecuación:

$$E \text{ (cal/g)} = \frac{T (1876) - (1400 \times \text{peso alambre usado}) - (1.38 \times \text{ml})}{\text{peso muestra}}$$

Donde

ml = ml de hidróxido de sodio 0.1N utilizado en la titulación.

$$T = (T_c - T_s) - V_1 + [V_2 \times (c-b)]$$

T_c = Temperatura máxima.

T_s = Temperatura a los 10 minutos.

$$V_1 = \frac{\text{Temp. 5 minutos} - \text{Temp. 10 minutos}}{5}$$

5

$$V_2 = \frac{T_c - \text{Temp. final}}{5}$$

5

$$B = (T_c - T_s) \times 0.6 + T_s$$

b = el minuto al que se tuvo la temperatura B

c = el minuto en que bajó la temperatura.

3) Proteína por el método de Macrokjeldhal automatizado (Kjeltec System, Dinamarca).

a) Se digiere 1.5g de muestra seca con 12.5ml de ácido sulfúrico concentrado, una tableta digestora de selenio, y unas perlas de ebullición. Se coloca el matraz en una parilla de calentamiento y se digiere hasta que el líquido en el matraz esté blanco.

b) Se destila el contenido del matraz enfriado y diluido con 75ml de agua destilada en el sistema automático de Kjeltec. Este equipo añade automáticamente las cantidades requeridas del indicador y del hidróxido de sodio. Se lee la medición directamente en el pánel digital del equipo. Se calcula el porcentaje de proteína en la muestra con la ecuación siguiente, utilizando un factor de 6.25:

$$\frac{(\text{Lectura} - \text{Blanco}) \times 0.014 \times N \text{ H}_2\text{SO}_4 \times 100}{\text{Peso Muestra}} \times 6.25$$

Peso Muestra

4) Grasa por el método de Soxhlet (Tecator: Soxtec System, HT).

a) Se pone a peso constante un matraz de bola con unas perlas de ebullición.

b) Se mide 1.5g de muestra seca y se le agrega 25ml de ácido clorídrico 2:1.

c) Se ensambla el refrigerante y se le aplica una fuente de calor durante 45 min. para extraer la grasa.

d) Se filtra y se deja secar el filtrado.

e) Se mide el contenido de grasa de la muestra en el sistema automatizado de Soxtec (Tecator: Soxtec System, HT.). Se calcula la concentración de grasa por 100g de material.

5) Minerales

a) Preparación de la muestra.

Método de digestión húmeda (Analytical Methods Perkin-Elmer. Agriculture Ay-5).

Se agrega 5ml de HNO₃ a 0.5g de muestra y se deja reposar 2-12 horas a temperatura ambiente. Se evapora el ácido a baja temperatura y se repite esta operación 4 veces más, dos veces adicionando 3ml de HNO₃, una vez con 3ml de HClO₄ y la última vez con 3ml de HCl. Se vacía el contenido final a un matraz volumétrico y se afora a 25ml. Se filtra y se guarda en frascos de plástico previamente purgados.

b) Se miden las muestras por el método de espectrofotometría de absorción atómica (Perkins-Elmer Modelo 2380) (Tabla 15).

Tabla 15.

Resumen de las condiciones de las mediciones de Fe, Mg, Zn y Ca.

MINERAL	LONGITUD DE ONDA	SLIT nm	SENSI- BILIDAD mg/L	INTER- VALO LINEAL	REACTIVO ELIMINAR INTERFER- ENCIA
Fe	248.3	0.2	0.100	5.0	H ₃ PO ₄
Mg	285.2	0.7	0.0078	0.5	LaCl ₃
Zn	213.9	0.7	0.018	1.0	-
Ca	422.7	0.7	0.092	5.0	LaCl ₃

c) Determinación de la concentración de cada mineral en mg mineral/100g de muestra.

Para calcular la concentración de cada uno de los minerales, se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{mg min./100g muestra} = \frac{[] \times \text{Aforo} \times V_r \times 100}{\text{pm} \times V_m \times 1000}$$

[] = concentración obtenida por regresión lineal a partir de la absorción medida para la muestra en función de la curva estándar correspondiente.

Aforo = Es el aforo inicial de las muestras digeridas (25ml).

V_r = volumen de la dilución efectuada.

pm = peso de la muestra.

V_m = volumen medido de la muestra.

6) Humedad por secado en estufa (Robertshaw, Pensilvania, PA 15697, Estados Unidos).

Se pone a peso constante una charola pequeña. Se mide 5g de muestra húmeda en la charola y se seca la muestra en una estufa a 70°C durante aproximadamente 3 horas. Se calcula el contenido de humedad por diferencia en el peso de la muestra y se lo informa en g/100 (%).

7) Cenizas (Thermolyne, Dubuque IV, Dubuque, Iowa, Estados Unidos).

a) Se pone a peso constante un crisol de porcelana.

b) Se coloca en el crisol 1.5g de muestra seca.

- c) Se carboniza la muestra en una campana de extracción bajo la flama de un mechero, hasta que no haya desprendimiento de humos.
- d) Se calcina la muestra en una mufla a 550°C hasta que las cenizas sean blancas o ligeramente grises (2 horas aprox.).
- e) Se calcula la cantidad de cenizas en 100g de muestra (%).

8) Hidratos de carbono por diferencia.

Se restan los porcentajes de los macrocomponentes de la muestra (Proteínas, grasa y cenizas) de 100% para dar el valor de hidratos de carbono en la muestra.

BIBLIOGRAFIA.

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. Nueva York y Londres. 1983.
2. Anónimo. Intestinal Permeability. *Lancet* 1985. i:256-8.
3. Barau, E. y Dupont, C. Modifications of Intestinal Permeability During Food Provocation Procedures in Pediatric Irritable Bowel Syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990. 11:72-77.
4. Beal, V.A. Nutrición en el ciclo de la vida. Limusa. Mexico, 1983.
5. Behrens, R.H., Docherty, H., Elia, M., y Neale, G. A Simple Enzymatic Method for the Assay of Urinary Lactulose. *Clin Chim Acta* 1984. 137:361-367.
6. Behrens, R.H., Lunn, P.G., Northrop, C.A., Hanlon, P.W., y Neale, G. Factors Affecting the Integrity of the Intestinal Mucosa of Gambian Children. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987. 45:1433-41.
7. Bingham, S. Definitions and Intake of Dietary Fiber. *Am J Clin Nutr* 1987. 45:1226-31.
8. Bjarnason, I., Peters, T.J. y Veall, N. ⁵¹Cr-EDTA Test for Intestinal Permeability. *Lancet* 1984. ii:523. (Carta al editor).
9. Bjarnason, I., Ward, K. y Peters, T.J. The Leaky Gut of Alcoholism: Possible Route of Entry for Toxic Compounds. *Lancet* 1984. i:179-182.

10. Bjarnason, I., Levi, S., Smethurst, P., Menzies, I.S., y Levi, A.J. Vindaloo and You. Br Med J 1988. 297:1629-1631.
11. Bond, J.H., y Levitt, M.D. Use of Pulmonary Hydrogen Measurements to Quantitate Carbohydrate Absorption. J Clin Invest 1972. 51:1219-25.
12. Bond, J.H. y Levitt, M.D. Investigation of Small Bowel Transit Time in Man Utilizing Pulmonary Hydrogen (H₂) Measurements. J Lab Clin Med 1975. 85:546-555.
13. Box, G.E., Hunter, W.G y Hunter, J.S. Statistics for the Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building. John Wiley and Sons. Nueva York. 1987.
14. Bright-See, E. y McKeown-Eyssen, G.E. Estimation of Per Capita Crude and Dietary Fiber Supply in 38 Countries. Am J Clin Nutr 1984. 39:821-829.
15. Brown, R.C., Kelleher, J. y Losowsky, M.S. The Effect of Pectin on the Structure and Function of the Rat Small Intestine. Br J Nutr 1979. 42:357-365.
16. Burkitt, D.P., Walker, A.R.P., y Painter, N.S. Effect of Dietary Fibre on Stools and Transit-Times, and its Role in the Causation of Disease. Lancet 1972. ii:1408-1411.
17. Calloway, D.H. y Kretsch, M.J. Protein and Energy Utilization in Men Given a Rural Guatemalan Diet and Egg Formulas with and without Added Oat Bran. Am J Clin Nutr 1978. 31:1118-1126.

18. Calvert, M.D., Schneeman, B.O., Satchithanandam, M.S., Cassidy, M.M., y Vahouny, G.V. Dietary Fiber and Intestinal Adaptation: Effects on Intestinal and Pancreatic Digestive Enzyme Activity. *Am J Clin Nutr* 1985. 41:1249-56.
19. Cassidy, M.M., Lightfoot, F.G., Grau, L.E., Story, J.A., Kritchevsky, D., y Vahouny, G.V. Effect of Chronic Intake of Dietary Fibers on the Ultrastructural Topography of Rat Jejunum and Colon: a Scanning Electron Microscopy Study. *Am J Clin Nutr* 1981. 34:218-228.
20. Cassidy, M.M., Lightfoot, F.G. y Vahouny, G.V. Dietary Fiber, Bile Acids, and Intestinal Morphology. En Vahouny, G.V. y Kritchevsky, D. (eds) Dietary Fiber in Health and Disease. Plenum Press. Nueva York y Londres. 1982.
21. Cassidy, M.M., Satchitanandam, S., Calvert, R.J., Vahouny, G.V., y Leeds, A.R. Quantitative and Qualitative Adaptation in Gastrointestinal Mucin with Dietary Fiber Feeding. En Dietary Fiber: Chemistry, Physiology, and Health Effects. Kritchevsky, D., Bonfield, C., y Anderson, J.W. (eds) Plenum Press. Nueva York y Londres. 1990.
22. Christman, N., y Hamilton, L.H. A New Chromatographic Instrument for Measuring Trace Concentrations of Breath-Hydrogen. *J Chromatogr* 1982. 229:259-65.
23. Cobden, I., Rothwell, J. y Axon, A.T.R. Intestinal Permeability and Screening Tests for Coeliac Disease. *Gut* 1980. 21:512-8.

24. Cobden, I., Hamilton, I., Rothwell, J., y Axon, A.T.R. Cellobiose/Mannitol Test: Physiological Properties of Probe Molecules and Influence of Extraneous Factors. Clin Chim Acta 1985. 148:53-62.
25. Cobden, I., Dickinson, R.J., Rothwell, J., y Axon, A.T.R. Intestinal Permeability Assessed by Excretion of Two Molecules: Results in Coeliac Disease. Lancet 1979. ii:1379. (Carta al editor).
26. Cook, J.D., Noble, N.L., Morck, T.A., Lynch, S.R., y Petersburg, S.J. Effect of Fiber on Nonheme Iron Absorption. Gastroenterology 1983. 85:1354-8.
27. Cooper, B.T., y Ukabam, S.O. Changes in Small Intestinal Permeability Reflect the Degree of Mucosal Abnormality in Coeliac Patients on a Gluten Free Diet. Dig Dis Sci 1984. 29:809-16.
28. Corcoran, A.C. y Page, I.H. A Method for the Determination of Mannitol in Plasma and Urine. J Biol Chem 1943. 170:165-171.
29. Dahlqvist, A. y Gryboski, J.D. Inability of the Human Small Intestinal Lactase to Hydrolyze Lactulose. Biochim Biophys Acta 1965. 110:635-636.
30. Daniels, W.W. Biostatística. Noriega-Limusa. 3ra ed. México. 1991.
31. Davies, N.T., y Nightingale, R. The Effects of Phytate on Intestinal Absorption and Secretion of Zinc, and Whole-body Retention of Zinc, Copper, Iron and Manganese in Rats. Br J Nutr 1975. 34:243-258.

32. Davies, N.T. The Effects of Dietary Fibre on Mineral Availability. En Dietary Fibre: current developments of importance to health. Heaton, K.W. (ed). Technomic Publishing Company Incorporated. Westport CT 06880. 1979.
33. Davies, N.T. Effects of Phytic Acid on Mineral Availability. En Vahouny, G.V. y Kritchevsky, D. (eds) Dietary Fiber in Health and Disease. Plenum Press. Nueva York y Londres. 1982.
34. Delahunty, T., y Hollander, D. Liquid Chromatographic Method for Estimating Urinary Sugars: Applicability to Studies of Intestinal Permeability. Clin Chem 1986. 32:1542-44.
35. Dong, M.W., Vandemark, F.L. y Passalacqua, P.V. Validating HPLC Methods using an Intelligent System Controller. Am Lab 1992.
36. Dreher, M.L. Handbook of Dietary Fiber: An Applied Approach. Marcel Dekker. Nueva York y Basel, 1987.
37. Dubois, D y Dubois, E.F. Arch Intern Med 1916. 17:863. Tomado de Manual de Terapéutica nutricional Alpers, D.H., Clouse, R.E. y Stenson W.F. Salvat. Barcelona, España. 1990.
38. Dunaif, G., y Schneeman, B.O. The Effect of Dietary Fiber on Human Pancreatic Enzyme Activity in Vitro. Am J Clin Nutr 1981. 34:1034-35.
39. Dupont, C. y Goutail-Flaud, M-F. Alterations of Intestinal Permeability to Sugars in Infants Following Neonatal Surgery. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1990. 11:66-71.
40. Eastwood, M.A. y Kay, R.M. An Hypothesis for the Action of Dietary Fiber along the Gastrointestinal Tract. Am J Clin Nutr 1979. 32:364-367.

41. Edwards, G.A. Physiological Effects of Fiber. En Dietary Fiber: Chemistry, Physiology and Health Effects. Kritchevsky, D., Bonfield, C., y Anderson, J.W. (eds) Plenum Press. Nueva York y Londres. 1990.
42. Edwards, C.A. y Rowlands, I.R. Bacterial Fermentation in the Colon and Its Measurement. En Schweizer, T.F. y Edwards, C.A. (eds) Dietary Fibre: a component of food. Springer-Verlag. Londres. 1992.
43. Eggum, B.O. The Influence of Dietary Fibre on Protein Digestion and Utilisation. En Schweizer, T.F. y Edwards, C.A. (eds) Dietary Fibre: a component of food. Springer-Verlag. Londres. 1992.
44. Elia, M., Behrens, R., Northrop, C., Wraight, P., y Neale, Evaluation of Mannitol, Lactulose and ⁵¹Cr-labelled Ethylenediaminetetra-acetate as Markers of Intestinal Permeability in Man. Clin Sci 1987. 73:197-204.
45. Elsenhans, B., Zenker, D., y Caspary, W.F. Guaran Effect on Rat Intestinal Absorption. Gastroenterology 1984. 86:645-653.
46. Fairweather-Tait, S.J., y Wright, A.J.A. The Effects of Sugar Beet Fibre and Wheat Bran on Iron and Zinc Absorption in Rats. Br J Nutr 1990. 64:547-552.
47. FAO/WHO/UNU. Energy and Protein Requirements. World Health Organization Technical Report Series 724. Geneva, 1985.

48. Fleming, S.C., Kapembwa, M.S., Laker, M.F., Levin, G.E., y Griffin, G.E. Rapid and Simultaneous Determination of Lactulose and Mannitol in Urine, by HPLC with Pulsed Amperometric Detection, for Use in Studies of Intestinal Permeability. Clin Chem 1990. 36:797-799.
49. Flourié, B. The Influence of Dietary Fibre on Carbohydrate Digestion and Absorption. En Schweizer, T.F. y Edwards, C.A. (eds) Dietary Fibre: a component of food. Springer-Verlag. Londres. 1992.
50. Food Processor II. Esha Research. Salem, Estados Unidos. 1990.
51. Ford, R.P.K., Menzies, I.S., Philips, A.D. y Walker-Smith, J.A. Intestinal Sugar Permeability: Relationship to Diarrheal Disease and Small Bowel Morphology. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1985. 4:568-574.
52. Fordtran, J.S., Rector Jr., F.C., Ewton, M.F., Soter, N., y Kinney, J. Permeability Characteristics of the Human Small Intestine. J Clin Invest 1965. 44:1935-1944.
53. Gearhart, H.L. Bose, D.P., Smith, C.A., Morrison, R.D., Welsh, J.D., y Smalley, T.K. Determination of Lactose Malabsorption by Breath Analysis with Gas Chromatography. Anal Chem 1976. 48:393-398.
54. Gomes, M.E., Lokschin, F., y Pounder, R.E. Non-invasive Assessment of Small Intestine Damage. Gut 1983. 24:A486.

55. Gorden, D.T., Besch-Willford, C., y Ellersieck, M.R. The Action of Cellulose on the Intestinal Mucosa and Element Absorption by the Rat. J Nutr 1983. 113:2545-56.
56. Haldorsen, K.M. Vanadium Pentoxide in Sulphuric Acid, a General Chromogenic Spray Reagent for Carbohydrates. J Chromatogr 1977. 134:467-476.
57. Hamilton, I., Hill, A., Bose, B., Bouchier, I.A.D y Forsyth, J.S. Small Intestinal Permeability in Pediatric Clinical Practice. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1987. 6:697-701.
58. Harris, C.E., Griffiths, R.D., Freestone, N., Billington, D., Atherton, S.T., y Macmillan, R.R. Intestinal Permeability in the Critically Ill. Intensive Care Med 1992. 18:38-41.
59. Iber, F.L. The Gastrointestinal Tract: an Overview of Function. En Goodhart, R.S., y Shils, M.E. Modern Nutrition in Health and Disease. 6th edition. Lea and Febiger. Philadelphia. 1980.
60. Isaksson, G., Lundquist, I., y Ihse, I. Effect of Dietary Fiber on Pancreatic Enzyme Activity in Vitro. Gastroenterology 1982. 82:918-24.
61. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Valor Nutritivo de los Alimentos Mexicanos. México. 1977.
62. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Valor Nutritivo de los Alimentos de Mayor Consumo en México. México. 1992.

63. Isolauri, E., Juntunen, M., Wiren, S., Vuorinen, P. y Koivula, T. Intestinal Permeability Changes in Acute Gastroenteritis: Effects of Clinical Factors and Nutritional Management. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989. 8:466-473.
64. Jacobs, L.R., y White, F.A. Modulation of Mucosal Cell Proliferation in the Intestines of Rats Fed a Wheat Bran Diet. *Am J Clin Nutr* 1983. 37:945-953.
65. Jacobs, L.R. Effects of Dietary Fiber on Mucosal Growth and Cell Proliferation in the Small Intestine of the Rat: a Comparison of Oat Bran, Pectin, and Guar with Total Fiber Deprivation. *Am J Clin Nutr* 1983. 37:954-960.
66. Jacobs, L.R., y Lupton, J.R. Effect of dietary fibers on rat large bowel mucosal growth and cell proliferation. *Am J Physiol* 1984. 246:G378-G385.
67. Jenkins, D.J.A., Newton, C., Leeds, A.R. y Cummings, J.H. Effect of Pectin, Guar Gum and Wheat Fibre on Serum-Cholesterol. *Lancet* 1975. i:1116-7.
68. Jenkins, D.J.A., Jenkins, A.L., Wolever, T.M.S., Vuksan, V., Brighenti, F., Cunnane, S., Venkat Rao, A., Thompson, L.U., y Josse, R.G. Lente Carbohydrate or Slowly Absorbed Starch. En Dietary Fiber: Chemistry, Physiology and Health Effects. Kritchevsky, D., Bonfield, C., Anderson, J.W. (eds) Plenum Press. Nueva York y Londres. 1990.
69. Johnson, I.T. y Gee, J.M. Effect of Gel-forming Gums on the Intestinal Unstirred Layer and Sugar Transport in Vitro. *Gut* 1981. 22:398-403.

70. Johnson, I.T. The Influence of Dietary Fibre on Lipid Digestion and Absorption. En Schweizer, T.F. y Edwards, C.A. (eds) Dietary Fibre: a component of food. Springer-Verlag. Londres. 1992.
71. Juby, L.D., Dixon, M.F., Axon, A.T.R. Abnormal Intestinal Permeability and Jejunal Morphometry. *J Clin Pathol* 1987. 40:714-718.
72. Juby, L.D., Rothwell, J., y Axon, A.T.R. Lactulose/Mannitol Test: An Ideal Screen for Celiac Disease. *Gastroenterology* 1989. 96:79-85.
73. Kelsay, J.L. Effect of Fiber on Mineral and Vitamin Bioavailability. En Vahouny, G.V. y Kritchevsky, D. (eds) Dietary Fiber in Health and Disease. Plenum Press. Nueva York y Londres. 1982.
74. Kotler, D.P. Holt, P.R., y Rosensweig, N.S. Modification of the Breath Hydrogen Test: Increased Sensitivity for the Detection of Carbohydrate Malabsorption. *J Lab Clin Med* 1982. 100:798-805.
75. Kritchevsky, D. Fiber and Lipids. En Vahouny, G.V. y Kritchevsky, D. (eds) Dietary Fiber in Health and Disease. Plenum Press. Nueva York y Londres. 1982.
76. Laker, M.F. Estimation of Disaccharides in Plasma and Urine by Gas-Liquid Chromatography. *J Chromatogr* 1979. 163:9-18.
77. Laker, M.F., y Mount, J.N. Mannitol Estimation in Biological Fluids by Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives. *Clin Chem* 1980. 26:441-443.

78. Leclercq-Foucart, J., Forget, P.P. y Van Cutsem, J.L. Lactulose-Rhamnose Intestinal Permeability in Children with Cystic Fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1987. 6:66-70.
79. Leeds, A.R. Modification of Intestinal Absorption by Fiber and Fiber Components. En Vahouny, G.V. y Kritchevsky, D. (eds) Dietary Fiber in Health and Disease. Plenum Press. Nueva York y Londres. 1982.
80. Lifschitz, C. Intestinal Permeability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985. 4:520-2.
81. Lindenbaum, J., Harmon, J.W. y Gerson, C.D. Subclinical Malabsorption in Developing Countries. *Am J Clin Nutr* 1972. 25:1056-61.
82. Loehry, C.A., Axon, A.T.R., Hilton, P.J., Hider, R.C. y Creamer, B. Permeability of the Small Intestine to Substances of Different Molecular Weight. *Gut* 1970. 11:466-470.
83. Loehry, C.A., Kingham, J. y Baker, J. Small Intestinal Permeability in Animals and Man. *Gut* 1973. 14:683-688.
84. Lunn, P.G. Northrop, C.A., y Northrop, A.J. Automated Enzymatic Assays for the Determination of Intestinal Permeability Probes in Urine. 2. Mannitol. *Clin Chim Acta* 1989. 183:163-170.
85. Lunn, P.G. Northrop-Clewes, C.A., y Downes, R.M. Intestinal Permeability, Mucosal Injury and Growth Faltering in Gambian Infants. *Lancet* 1991. 338:907-910.

86. Mejía, L.A. Introducción al Simposio: el Papel de la Industria en la Educación en Alimentación y Salud. En Mejía, L.A., Bourges, H. y Rosado, J.L. (eds) Fibra y Salud. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Mexico City. 1989.
87. Menzies, I.S., Pounder, R., Heyer, S., Laker, M.F., Bull, J., Wheeler, P.G., y Creamer, B. Abnormal Intestinal Permeability to Sugars in Villous Atrophy. *Lancet* 1979. ii:1107-1109.
88. Munoz, J.M. Interactions of Dietary Fiber and Nutrients. En Vahouny, G.V. y Kritchevsky, D. (eds) Dietary Fiber in Health and Disease. Plenum Press. Nueva York y Londres. 1982.
89. Murphy, M.S., Sheldon, W., Brunetto, A., Pearson, A.D.J., Laker, M.F., Eastham, E.J., y Nelson, R. Active and Passive Sugar Absorption in Pancreatic Insufficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989. 8:189-194.
90. Nathavitharana, K.A., Lloyd, D.R., Raafat, F., Brown, G.A., y McNeish, A.S. Urinary Mannitol:Lactulose Excretion Ratios and Jejunal Mucosal Structure. *Arch Dis Child* 1988. 63:1054-1059.
91. Northrop, C.A. Lunn, P.G., y Behrens, R.H. Automated Enzymatic Assays for the Determination of Intestinal Permeability Probes in Urine. 1. Lactulose and Lactose. *Clin Chim Acta* 1990. 187:79-88.
92. Oku, T., Konishi, F y Hosoya, N. Mechanism of Inhibitory Effect of Unavailable Carbohydrate on Intestinal Calcium Absorption. *J Nutr* 1982. 112:410-415.

93. Paulini, I., Mehta, T., y Hargis, A. Intestinal Structural Changes in African Monkeys after Long Term Psyllium or Cellulose Feeding. *J Nutr* 1987. 117:253-266.
94. Read, N.W., y Eastwood, M.A. Gastrointestinal Physiology and Function. En Schweizer, T.F., y Edwards, C.A. (eds) Dietary Fibre - a Component of Food- Nutritional Function in Health and Disease. Springer-Verlag. Londres. 1992.
95. Reinhold, J.G. Zinc and Mineral Deficiencies in Man: The Phytate Hypothesis. *Proc 9th Congress Nutrition* 1972. 1:115-122.
96. Reinhold, J.G., Lahimgarzadeh, A., Nasr, K., y Hedayati, H. Effects of Purified Phytate and Phytate-Rich Bread upon the Metabolism of Zinc, Calcium, Phosphorous and Nitrogen in Man. *Lancet* 1973. i:283-288.
97. Reinhold, J.G., García L., P.M., Arias-Amado, L. y Garzón, P. Dietary Fiber-Iron Interactions. En Vahouny, G.V. y Kritchevsky, D. (eds) Dietary Fiber in Health and Disease. Plenum Press. Nueva York y Londres. 1982.
98. Roberts, M.B.V. Biology - A Functional Approach (2nd Ed). Nelson. Inglaterra. 1979.
99. Rosado, J.L. y Solomons, N.W. Storage of Hydrogen Breath-Test Samples in Plastic Syringes. *Clin Chem* 1983. 29:583-4
100. Rosado, J.L. Torres, L., y Solomons, N.W. Chromatograph with External Column Evaluated for Determining Breath Hydrogen in Clinical Studies. *Clin Chem* 1984. 30:1838-1842.
101. Rosado, J.L. Análisis de Hidrógeno Espirado como Índice de Adsorción de Carbohidratos. *Rev Invest Clin* 1985. 37:261-270.

102. Rosado, J.L. Fibra Dietética: Definición, Propiedades, Fisicoquímicas, Fisiológicas, y sus Implicaciones en la Salud. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. México. 1989.
103. Rosado, J.L., López, P., Morales, M., y Allen, L.H. Fiber Digestibility and Breath-Hydrogen Excretion in Subjects Consuming Rural and Urban Mexican Diets. *Am J Clin Nutr* 1991. 53:55-60.
104. Rosado, J.L., López, P., Morales, M., Muñoz, E. y Allen, L.H. Bioavailability of Energy, Fat, Zinc, Iron and Calcium from Rural and Urban Mexican Diets. *Br J Clin Nutr* 1992. 68:45-58.
105. Rosado, J.L., López, P., Huerta, Z., Muñoz, E., y Mejía, L. Dietary Fiber in Mexican Foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 1993. 6:215-222.
106. Rossander, L., Sandberg, A-S. y Sandstrom. B. The Influence of Dietary Fibre on Mineral Absorption and Utilisation. En Dietary Fibre - a Component of component of food. Schweizer, T.F. y Edwards, C.A. (eds). Springer-Verlag. Londres. 1992.
107. Sandstrom, B., Davidsson, L., Kivisto, B., Hasselblad, C., y Cederblad, A. The Effect of Vegetables and Beet Fibre on the Absorption of Zinc in Humans from Composite Meals. *Br J Nutr* 1987. 58:49-57.
108. Schenk, E.A., Klipstein, F.A. y Tomasini, J.T. Morphologic Characteristics of Jejunal Biopsies from Asymptomatic Haitians and Puerto Ricans. *Am J Clin Nutr* 1972. 25:1080-83.
109. Schneeman, B.O. Effect of Plant Fiber on Lipase, Trypsin and Chymotrypsin Activity. *J Food Sci* 1978. 43:634-5.

110. Schneeman, B.O. y Galliaher, D. Changes in Small Intestinal Digestive Enzyme Activity and Bile Acids with Dietary Cellulose in Rats. *J Nutr* 1980. 110:584-590.
111. Schneeman, B.O. Pancreatic and Digestive Function. En Vahouny, G.V. y Kritchevsky, D. (eds) Dietary Fiber in Health and Disease. Plenum Press. Nueva York y Londres. 1982.
112. Schneeman, B.O. Dietary Fiber and Gastrointestinal Function. *Nutr Rev* 1987. 45:129-132.
113. Schneeman, B.O. Dietary Fiber. *Food Tech* 1989. 43:133-139.
114. Schneeman, B.O. Macronutrient Absorption. En Dietary Fiber: Chemistry, Physiology, and Health Effects. Kritchevsky, D., Bonfield, C., y Anderson, J.W. (eds) Plenum Press. Nueva York y Londres. 1990.
115. Schwartz, S.E. y Levine, G.D. Effects of Dietary Fiber on Intestinal Glucose Absorption and Glucose Tolerance in Rats. *Gastroenterology* 1980. 79:833-6.
116. Shiau, S-Y., y Chang, G.W. Effects of Certain Dietary Fibers on Apparent Permeability of the Rat Intestine. *J Nutr* 1986. 116:223-232.
117. Shippee, R.L., Johnson, A.A., Cioffi, W.E., Lasko, J., LeVoyer, T.E., y Jordan, B.S. Simultaneous Determination of Lactulose and Mannitol in Urine of Burn Patients by Gas-Liquid Chromatography. *Clin Chem* 1992. 38:343-345.

118. Sigleo, S. Jackson, M.J., y Vahouny, G.V. Effects of Dietary Fiber Constituents on Intestinal Morphology and Nutrient Transport. *Am J Physiol* 1984. 246/1:G34-39.
119. Solomons, N.W., Viteri, F.E., y Hamilton, L.H. Application of a Simple Gas Chromatographic Technique for Measuring Breath Hydrogen. *J Lab Clin Med* 1977. 90:856-862.
120. Sorensen. *Biochem Z.* 21, 131 (1909); 22, 352 (1909). Doble referencia tomada de Wood, W. (ed) Methods in Enzymology Vol 182. Academic Press. Nueva York. 1990.
121. Southgate, D.A.T. Digestion and Absorption of Nutrients. En Dietary Fiber in Health and Disease. Vahouny, G.V., y Kritchensky, D. (eds) Plenum Press. Nueva York y Londres. 1982.
122. Southgate, D.A.T. The Dietary Fibre Hypothesis: A Historical Perspective. En Schweizer, T.F. y Edwards, C.A. (eds) Dietary Fibre: a component of food. Springer-Verlag. Londres 1992.
123. Stock-Damgé C., Aprahamian, M., Raul, F., Humbert, W., y Bouchet, P. Effect of Wheat Bran on the Exocrine Pancreas and Small Intestinal Mucosa of the Dog. *J Nutr* 1984. 114:1076-1082.
124. Story, J.A. y Kelley, M.J. Dietary Fiber and Lipoproteins. En Vahouny, G.V. y Kritchevsky, D. (eds) Dietary Fiber in Health and Disease. Plenum Press. Nueva York y Londres. 1982.
125. Story, J.A. y Thomas, J.N. Modification of Bile Acid Spectrum by Dietary Fiber. En Vahouny, G.V. y Kritchevsky, D. (eds) Dietary Fiber in Health and Disease. Plenum Press. Nueva York y Londres. 1982.

126. Sullivan, P.B., Marsh, M.N., Mirakian, R., Hill, S.M., Milla, P.J. y Neale, G. Chronic Diarrhea and Malnutrition - Histology of the Small Intestinal Lesion. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991. 12:195-203.
127. Sullivan, P.B., Lunn, P.G., Northrop-Clewes, C., Crowe, P.T., Marsh, M.N. y Neale, G. Persistent Diarrhea and Malnutrition - The Impact of Treatment on Small Bowel Structure and Permeability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992. 14:208-215.
128. Sundqvist, T., Magnusson, K-E., Sjobahl, R., Stjernstrom, I., y Tagesson, C. Passage of Molecules through the Wall of the Gastrointestinal Tract. II. Application of Low-molecular Weight Polyethyleneglycol and a Deterministic Mathematical Model for Determining Intestinal Permeability in Man. *Gut* 1980. 21:208-214.
129. Swindell, T.E., y Johnson, I.T. The Effect of Prolonged Dietary Supplementation with Guar Gum on Subsequent Iron Absorption and Retention in Rats. *Br J Nutr* 1987. 57:245-253.
130. Tasman-Jones, C., Jones, A.L., y Owen, R.L. Jejunal Morphology Consequences of Dietary Fiber in Rats. *Gastroenterology* 1978. 74:1102.
131. Trowell, H et al. Dietary Fibre Redefined. *Lancet* 1976. i:967. (Carta al editor).
132. Vahouny, G.V. Dietary Fibers and Intestinal Absorption of Lipids. En Vahouny, G.V. y Kritchevsky, D. (eds) Dietary Fiber in Health and Disease. Plenum Press. Nueva York y Londres. 1982.

133. Vahouny, G.V., Le, T., Ifrim, I., Satchithanandam, S., y Cassidy, M.M. Stimulation of Intestinal Cytokinetics and Mucin Turnover in Rats Fed Wheat Bran or Cellulose. *Am J Clin Nutr* 1985. 41:895-900.
134. Vahouny, G.V., y Cassidy, M.M. Dietary Fibers and Absorption of Nutrients. *Proc Soc Exp Biol Med* 1985. 180:432-446.
135. Walker, A.R.P. Effect of High Crude Fiber Intake on Transit Time and the Absorption of Nutrients in South African Negro Children. *Am J Clin Nutr* 1975. 28:1161-1169.
136. Walker, W.A. y Isselbacher, K.J. Uptake and Transport of Macromolecules by the Intestine. *Gastroenterology* 1974. 67:531-550.
137. Welsh, J.D. LaVerne Payne, D., Manion, C., Morrison, R.D., y Nichols, M.A. Interval Sampling of Breath Hydrogen (H₂) as an Index of Lactose Malabsorption in Lactase-Deficient Subjects. *Dig Dis Sci* 1981. 26:681-5.
138. Willems, D., Carandel, S. y Jacobs, W. Measurement of Urinary Sugars by HPLC in the Estimation of Intestinal Permeability: Evaluation in Pediatric Clinical Practice. *Clin Chem* 1993. 39:888-90.
139. Wolever, T. Avances Recientes sobre el Efecto de la Fibra Dietética en la Utilización de la Glucosa y el Metabolismo de los Lípidos. En Mejía, L.A., Bourges, H. y Rosado, J.L.(eds). Fibra y Salud. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. México. 1989.

140. Wrick, K.L., Robertson, J.B., Van Soest, P.J., Lewis, B.A., Rivers, J.M., Roe, D.A., Hackler, L.R. The Influence of Dietary Fiber Source on Human Intestinal Transit Time and Stool Output. *J Nutr* 1983. 113:1464-1479.
141. Yamanaka, K. D-Mannitol Dehydrogenase from Leuconostoc mesenteroides (138-142); en Wood, W. (ed). Methods in Enzymology. Vol 41B. Academic Press. Nueva York. 1975.