

**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**FACULTAD DE BIOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

**EFFECTOS DE LAS POLIAMINAS Y LOS  
FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS DE LA DIETA SOBRE LA  
MADURACIÓN INTESTINAL EN CERDOS  
DESTETADOS PRECOZMENTE**

Memoria presentada por la Lcda. **D<sup>a</sup> María Sabater Molina** para optar al **GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA** por la **Universidad de Murcia**, Septiembre 2008.



## **AGRADECIMIENTOS**

*Escribir los agradecimientos de esta memoria de Tesis Doctoral significa haber concluido un intenso trabajo que no hubiera sido posible sin la colaboración de todas aquellas personas o entidades que cito a continuación y a quienes quiero expresar mi más sincero agradecimiento.*

*En primer lugar, quiero agradecerle al Dr. Salvador Zamora Navarro, director de esta Tesis Doctoral y a quien tanto admiro, la confianza que siempre ha mostrado en mí, así como su apoyo incondicional tanto en el campo profesional como personal. Hace ya seis años, escuché una charla para los alumnos internos que nos incorporábamos al departamento y una frase que me quedó grabada es “aquí somos como una familia”. Gracias Salvador por tu cercanía, por tus sabios consejos y por acogerme como un miembro más de tu familia.*

*A la Dra. Elvira Larqué Daza, directora de esta Tesis Doctoral y a quien considero una amiga, le quiero agradecer todo lo que he aprendido durante estos cuatro años, su trabajo, experiencia e interés en todo momento. Gracias Elvira, por dirigirme la tesis y soportarme durante todo este tiempo.*

*Debo también agradecer al Dr. Francisco Torrella Matéu el permitirme trabajar en el Departamento de Microbiología e intentar que me sintiera como en mi departamento. Gracias por su dirección y buenos consejos.*

*También quiero agradecer a la Dra. Francisca Pérez Llamas su interés y dedicación en todo momento a mí y a todas las personas que forman este grupo.*

*A la empresa DANONE S.A. por haberme concedido una beca para la realización del proyecto de investigación “Mecanismo de acción de los alimentos funcionales prebióticos” que me ha permitido la realización de esta Tesis Doctoral, especialmente a la Dr. Helena Corominola Ocaña por su comprensión.*

*Al Dr. Carlos Belmonte de la Fundación Universidad Empresa de la Región de Murcia (FUEM) por su paciencia y “colaboración burocrática”.*

*A la Dr. Blanca Agulleiro y la Dr. Maria Teresa Lozano del Departamento de Biología Celular por permitirme realizar los cortes histológicos en su laboratorio.*

*A la Dr. Maria Teresa Castell del servicio de imagen del SACE, por su simpatía y ayuda en la realización de los estudios histológicos.*

*Al Dr. Ángel Gil de la Universidad de Granada, por acogerme en su laboratorio para que pudiera aprender las técnicas de microbiología.*

*A los Drs. Antonio Muñoz, Guillermo Ramis Vidal y José Salvador Martínez Martínez por su experiencia y colaboración en el sacrificio de los animales. De forma particular, quiero agradecer al Dr. Antonio Muñoz su ayuda y consejos durante el transcurso del cuidado de los animales y mi estancia en la Granja Veterinaria de la Universidad de Murcia.*

*La realización de esta Tesis Doctoral tampoco hubiera sido posible sin la colaboración y ayuda del gran colectivo humano que forman los miembros del departamento de Fisiología de esta Facultad. Gracias a todo el profesorado de la unidad docente de fisiología animal, en especial al Dr. Javier Martínez por su simpatía y esas largas charlas (cualquier tema es bueno). Quiero agradecerle al Dr. José Ángel López su ayuda y su colaboración incondicional. A la Dr. Marta Garaulet por transmitirme un especial entusiasmo por la investigación. Al Dr. Jorge de Costa y la Dra. Pilar Mendiola por su disposición para ayudar en todo momento. Al Dr. Juan Francisco Marín por sus historias y compañía.*

*Quiero expresar mi más profundo agradecimiento y simpatía a todos mis compañeros del departamento de fisiología, empezando por aquellos que ya no están pero perduran en la amistad, a M<sup>a</sup> José, Marian, Carmen, Elena, Charo, Almudena y Juan Antonio, por esos cortos pero intensos cafés en la cantina, por ayudarme en mis comienzos difíciles. A M<sup>a</sup> Dolores por esos consejos y las conversaciones de la tarde. Y agradecerles a los que todavía quedan y empiezan su carrera en el departamento, especialmente a Puri por su cercanía, pero sin olvidar a Celia, Juanjo, Carmen, Lola, Lorena y muchos más que me dejo en el camino.*

*Muchas gracias a mis “compis de micro” y ahora amigas, Paqui y Aixa, por todas esas risas que nos hemos dado juntas.*

*A mis compañeros de la granja Miguel y Antonio, muchas gracias por hacerme tan fácil y divertido el estar con los animales de día y de noche. Agradeceros también vuestra ayuda y experiencia en su cuidado.*

*A Javi Plaza por su gran amistad, por aguantar mis continuas preguntas al principio y mis quejas al final. Por ayudarme con la realización de este proyecto en todo momento.*

*A Ana y Susana, compañeras y amigas, gracias por vuestro interés y por escucharme todos los días.*

*También agradecer a todos mis amigos (Fani, Musa, Bea, Paco, Sonia, Cristina, Viki y todos los demás) lo bien que lo hemos pasado durante todo este tiempo, su apoyo y palabras de ánimo, por escucharme y estar a mi lado.*

*A mis hermanos Jose y Marta, y sin olvidarme de Esperanza y Fran (por supuesto), muchas gracias por vuestro cariño y por estar ahí siempre.*

*A mis padres que confían en mí y me muestran un apoyo infinitamente incondicional. Gracias por vuestra continua preocupación y por quererme tanto.*

*Finalmente, debo un agradecimiento especial a mi marido Álvaro, que ha sabido comprender la importancia que para mí ha representado el poder realizar este proyecto. Espero que sepa disculparme por todo el tiempo que le he robado.*



*A mis padres*

*A mis hermanos*



*A Álvaro*



## ÍNDICE

---

<b>I</b>	<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b> .....	<b>5</b>
1.	POLIAMINAS.....	7
1.1	Descubrimiento.....	9
1.2	Distribución.....	10
1.3	Estructura y propiedades.....	11
1.4	Determinación de poliaminas .....	13
1.5	Fuentes de poliaminas.....	14
1.5.1	<i>Poliaminas endógenas</i> .....	14
1.5.2	<i>Poliaminas exógenas</i> .....	17
1.6	Metabolismo de las poliaminas.....	17
1.6.1	Absorción.....	17
1.6.2	<i>Metabolismo</i> .....	19
1.6.3	<i>Catabolismo</i> .....	22
1.7	Funciones fisiológicas.....	22
1.7.1	<i>Efectos sobre la proliferación celular y la apoptosis</i> .....	22
1.7.2	<i>Efectos sobre la maduración intestinal</i> .....	25
1.7.3	<i>Efectos sobre el sistema inmune</i> .....	27

1.7.1	<i>Efectos sobre la proliferación celular y la apoptosis</i> .....	22
1.7.2	<i>Efectos sobre la maduración intestinal</i> .....	25
1.7.3	<i>Efectos sobre el sistema inmune</i> .....	27
1.7.4	<i>Interacción con el ADN</i> .....	28
1.8	Contenido de poliaminas en los alimentos.....	29
1.9	Poliaminas en la leche materna y su papel en el neonato .....	32
1.10	Nuevos avances en la aplicación de las poliaminas.....	34
2.	OLIGOSACÁRIDOS .....	39
3.	FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS.....	40
3.1	Propiedades de los fructooligosacáridos.....	40
3.1.1	<i>Estructura química y producción</i> .....	40
3.1.2	<i>Cuantificación de los FOS</i> .....	44
3.1.3	<i>Propiedades fisicoquímicas</i> .....	45
3.1.4	<i>Aplicaciones generales de los FOS</i> .....	46
3.2	Contenido de FOS en los alimentos.....	47
3.3	Efectos beneficiosos de los FOS sobre el organismo .....	50
3.3.1	<i>Efecto prebiótico</i> .....	50
3.3.2	<i>Efectos relacionados con la producción de ácidos grasos de cadena corta</i> .....	52

3.3.3	<i>Alivio del estreñimiento</i>	52
3.3.4	<i>Efectos sobre la absorción de minerales</i>	54
3.3.5	<i>Regulación del metabolismo lipídico</i>	55
3.3.6	<i>Influencia sobre la glicemia/insulinemia</i>	56
3.3.7	<i>Disminución del riesgo de cáncer de colon</i>	57
3.3.8	<i>Modulación del sistema inmune</i>	58
3.4	Fructooligosacáridos en la leche materna y su papel en el neonato	59
3.4.1	<i>Beneficios del aporte de oligosacáridos en la leche materna</i>	60
3.4.2	<i>Posibles efectos de la adición de FOS a las fórmulas infantiles</i>	62
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>		<b>65</b>
1.	ANIMALES Y DIETAS	67
2.	PROTOCOLO DE DISECCIÓN	71
3.	MÉTODOS ANALÍTICOS	73
3.1	Análisis histológico de la mucosa intestinal	73
3.2	Análisis enzimáticos de la mucosa de yeyuno y ciego	74
3.2.1	<i>Determinación de proteínas</i>	74
3.2.2	<i>Enzimas marcadoras de la funcionalidad intestinal</i>	76
3.3	Determinación de poliaminas	79
3.3.1	<i>Determinación de poliaminas en leche de cerda</i>	80

4.	ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS .....	81
4.1	Recuentos, aislamientos y caracterización bacteriana .....	81
4.2	Producción de poliaminas bacterianas .....	82
4.3	Estudio dosis-dependiente sobre la influencia de la concentración de FOS y la producción de poliaminas bacterianas .....	83
4.4	Composición de los medios de cultivo .....	84
4.4.1	<i>Medio de Berens</i> .....	84
4.4.2	<i>Medio base de agar Columbia sangre</i> .....	85
4.4.3	<i>Medio de Falkow</i> .....	85
4.4.4	<i>Medio agar MacConkey n°3</i> .....	86
4.4.5	<i>Medio agar reforzado para clostridios</i> .....	87
4.4.6	<i>Medio agar Rogosa</i> .....	88
4.4.7	<i>Agar Wilkins-chalgren para anaerobios</i> .....	88
4.4.8	<i>Medio agar dextrosa Sabouraud</i> .....	89
5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	90
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>91</b>
1.	PESOS DE LOS ANIMALES .....	93
2.	INGESTAS DE LOS ANIMALES.....	95
3.	MATERIAL CECAL.....	96
4.	RESULTADOS EN INTESTINO DELGADO .....	96

4.1	Histología del intestino delgado.....	97
4.1.1	<i>Medida de la profundidad de las criptas intestinales.....</i>	97
4.1.2	<i>Medida de la longitud de las vellosidades intestinales.....</i>	98
4.2	Actividades enzimáticas en mucosa de intestino delgado .....	101
4.2.1	<i>Actividades fosfatasa alcalina y <math>\gamma</math>-glutamil transferasa.....</i>	101
4.2.2	<i>Actividades de las enzimas disacaridasas .....</i>	104
4.3	Análisis de poliaminas en intestino delgado .....	105
5.	RESULTADOS EN INTESTINO GRUESO .....	108
5.1	Resultados microbiológicos en ciego.....	108
5.1.1	<i>Recuento de microorganismos anaerobios estrictos y facultativos en medio Wilkins.....</i>	108
5.1.2	<i>Recuento de esporas de clostridios en medio “Reinforced clostridial agar” .....</i>	110
5.1.3	<i>Recuento de bifidobacterias en medio Berens.....</i>	111
5.1.4	<i>Recuento selectivo de lactobacilos en medio Rogosa.....</i>	113
5.1.5	<i>Recuento de viables en medio MacConkey.....</i>	114
5.1.6	<i>Recuento de microorganismos aerobios en medio Columbia.....</i>	115
5.1.7	<i>Recuento de mohos y levaduras en medio agar de Sabouraud .....</i>	117
5.2	Histología de ciego .....	118
5.3	Actividades enzimáticas en mucosa de ciego .....	119

5.4	Análisis de poliaminas en ciego.....	122
6.	AISLAMIENTO DE LAS CEPAS BACTERIANAS SELECCIONADAS POR LOS FOS.....	125
7.	PRODUCCIÓN DE POLIAMINAS POR LAS CEPAS BACTERIANAS SELECCIONADAS POR LOS FOS.....	129
8.	ESTUDIO DOSIS-DEPENDIENTE ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE FOS Y LA PRODUCCIÓN DE POLIAMINAS BACTERIANAS .....	132
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>139</b>
1.	INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN DE POLIAMINAS EN LA DIETA A NIVEL DE INTESTINO DELGADO .....	142
2.	INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN DE FOS EN LA DIETA Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE POLIAMIANAS BACTERIANAS.. .....	148
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>159</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>165</b>
	<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>I</b>
	<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>IV</b>
	<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>VIII</b>

# *I. Justificación y objetivos*



Motherhood, Diego Rivera



El cerdo es comúnmente usado como modelo nutricional para estudios nutricionales en la etapa neonatal en humanos (Miller & Ullrey, 1987; Shulman, 1993). Los cerdos tienen muchas similitudes fisiológicas con los humanos, lo que los hace candidatos ideales para la investigación biomédica. Al nacer, el lechón está aproximadamente en la misma etapa de desarrollo que los niños prematuros; además, el tracto gastrointestinal de humanos y cerdos es morfológicamente e histológicamente similar. Por tanto, experimentos *in vivo* que serían difíciles y poco éticos de realizar en humanos en la etapa neonatal, pueden ser exitosos en un modelo como el cerdo. Los estudios de desarrollo y crecimiento intestinal en cerdos jóvenes también pueden ser aplicados a problemas de salud humanos. Por ejemplo, pacientes expuestos a enfermedades intestinales, cirugía, cáncer o quimioterapia a menudo experimentan problemas digestivos y nutricionales debido a daños en la estructura del tracto gastrointestinal que afectan a la digestión y absorción de nutrientes (Gardiner *et al.*, 1995). En definitiva, las investigaciones en un modelo animal como el cerdo sobre como estimular el desarrollo intestinal podrían ser también aplicadas a estos problemas clínicos humanos. Esta ha sido la razón por la que se ha utilizado el cerdo en la presente investigación.

Dada la trascendencia de la alimentación para el óptimo desarrollo humano tanto físico como intelectual en las primeras etapas de la vida, la incorporación de nuevos ingredientes funcionales a las leches infantiles es hoy objeto de numerosos estudios, dando cada vez productos más novedosos y semejantes a la leche humana, patrón de oro, que los contiene en forma natural (Rivero Urgell *et al.*, 2005).

Los prebióticos, son generalmente componentes no digeribles de un alimento que al ingerirse promueven el crecimiento y establecimiento de gérmenes beneficiosos de la microbiota intestinal. La flora intestinal se adquiere durante el periodo neonatal y permanece más o menos estable el resto de la vida y aunque depende de diversos factores, como el uso de antibióticos o la dieta, no es fácil modificarla de forma definitiva. En los últimos años se ha recurrido a sustancias que están de manera natural en los alimentos o que pueden añadirse a éstos y que favorecen la presencia y las acciones de los gérmenes probióticos. Las sustancias mejor estudiadas por su efecto prebiótico son los oligosacáridos y glicoconjugados de la leche humana y los

fructoligosacáridos (FOS) encontrados en frutas y hortalizas (Gibson & Roberfroid, 1995; Delzenne, 2003; Gibson *et al.*, 2004). Sin embargo, los efectos de su adición a fórmulas de inicio está aun bajo estudio y no está claro si son capaces de mejorar la maduración intestinal y no sólo modificar la microbiota.

Por otra parte, las poliaminas son moléculas que están implicadas en el crecimiento y la diferenciación celular. Éstas están presentes en la leche materna y podrían ser importantes en la maduración intestinal del neonato. El aporte de poliaminas exógenas proviene fundamentalmente de la alimentación. Además los productos del metabolismo bacteriano contribuyen con gran cantidad de poliaminas al tracto intestinal (Bardócz *et al.*, 1995; Buts, 1996). El efecto de estas sustancias sobre la maduración intestinal podría tener gran repercusión en la alimentación de niños con problemas a nivel intestinal como los prematuros.

El propósito de este estudio ha sido conocer el efecto de las poliaminas en fórmulas infantiles sobre la maduración intestinal en la etapa neonatal, y asimismo, investigar los efectos de los FOS sobre la microbiota y maduración del intestino grueso, y ver si su respuesta está mediada por la producción de poliaminas aportadas por la microbiota bacteriana que los FOS seleccionan.

Para ello se establecieron los siguientes objetivos:

1. Comprobar si la adición de poliaminas a fórmulas infantiles en dosis fisiológicas puede mejorar la maduración intestinal de los neonatos.
2. Establecer si se producen cambios en la microbiota intestinal de los neonatos como consecuencia de la presencia de FOS en la etapa neonatal a dosis fisiológicas (8 g/L).
3. Conocer los efectos de los FOS sobre la maduración del intestino grueso.
4. Evaluar si los efectos de los FOS sobre el intestino grueso están mediados por la producción de poliaminas aportadas por la biota bacteria que ellos seleccionan.

## *II. Antecedentes bibliográficos*



Piggies, Franz Marc



## *Poliaminas*



*Antony van Leeuwenhoek (1632-1723)*  
*Descubrió las poliaminas en el semen humano*



## **1. POLIAMINAS**

### **1.1 Descubrimiento**

Las células de todos los organismos contienen pequeñas moléculas orgánicas nitrogenadas cargadas positivamente denominadas poliaminas. Aunque sus funciones no están completamente caracterizadas, de forma genérica, las poliaminas se consideran moduladoras del crecimiento y el metabolismo celular.

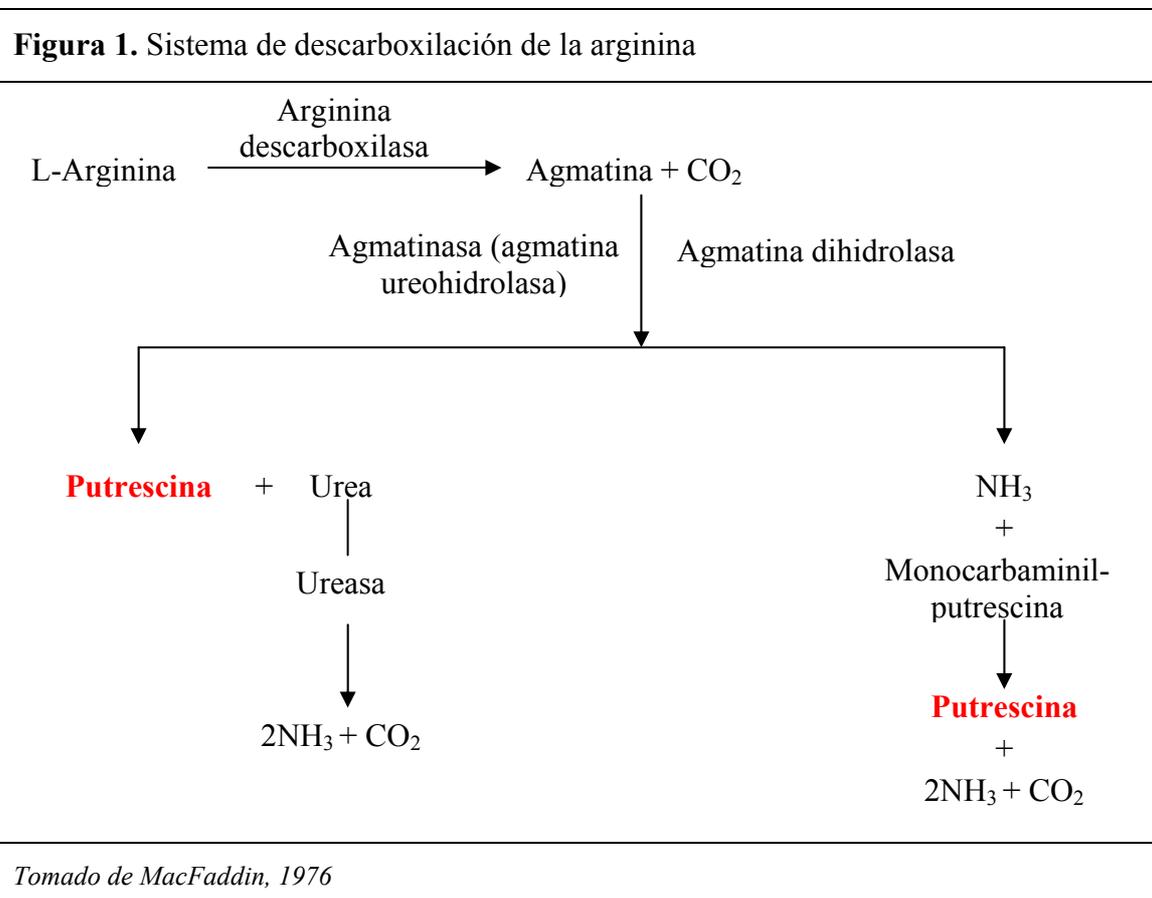
La presencia de poliaminas en materiales biológicos se señaló hace más de 300 años. En 1678, Antoni van Leeuwenhoek descubrió la presencia de cristales en el semen humano. En 1791, Nicolas Vauquelin redescubrió esos cristales y demostró su relativa insolubilidad en agua y etanol, concluyendo que eran sales de fosfato de un catión inorgánico, probablemente de calcio. Muchos investigadores descubrieron los cristales que se forman en el semen. Sin embargo, la naturaleza de esta sustancia cristalizada no se identificó claramente hasta un siglo después. En 1865 los cristales fueron descritos nuevamente por Boettcher, quien supuso que la sustancia de la que estaban formados era una proteína, a la que llamó espermatina. Se atribuye a Schreiner, en 1878, el descubrimiento de que los cristales son sales de fosfato de un compuesto orgánico básico simple. En 1886, A. Landenburg y J. Abel, dieron el nombre de espermina a esta base orgánica, por encontrarse en cantidades particularmente altas en el semen humano. Finalmente en 1924, Otto Rosenheim determinó la estructura química correcta de la espermina, sintetizando después otra base identificada como fosfato de espermidina.

Después de dilucidar su estructura, la espermidina fue aislada de órganos de animales, así como de microorganismos y plantas, resultando ser una poliamina universal. El descubrimiento de la putrescina y la cadaverina se atribuye al trabajo de Brieger en 1885, quien aisló estas bases como sales dobles de metales pesados del tejido animal. Estas bases fueron obtenidas mediante el mismo proceso a partir de muchos cultivos bacterianos, así como de tejidos de plantas y animales en diferentes estados, frecuentemente en condiciones de fermentación o putrefacción. La putrescina, espermidina y espermina constituyen el grupo de poliaminas que ha sido más estudiado,

aunque existen otras aminas (histamina, cadaverina, etc) que han sido detectadas en varios sistemas biológicos. Las poliaminas además de encontrarse en forma de bases alifáticas libres, pueden existir conjugadas con carbohidratos, esteroides, fosfolípidos y péptidos, así como unidades subestructurales dentro de numerosas familias de alcaloides (Olle, 1986).

## 1.2 Distribución

Las poliaminas están ampliamente distribuidas en los sistemas biológicos, aunque las concentraciones relativas de putrescina, espermidina y espermina varían notablemente entre los distintos tipos celulares. En general, los procariotas tienen concentraciones más altas de putrescina que de espermidina y carecen de espermina. En las células animales esta diamina se obtiene de la ornitina, sin embargo, en las células vegetales superiores, bacterias y hongos, la putrescina puede obtenerse a partir de agmatina, que a su vez es producida por la descarboxilación de la arginina (**Figura 1**).



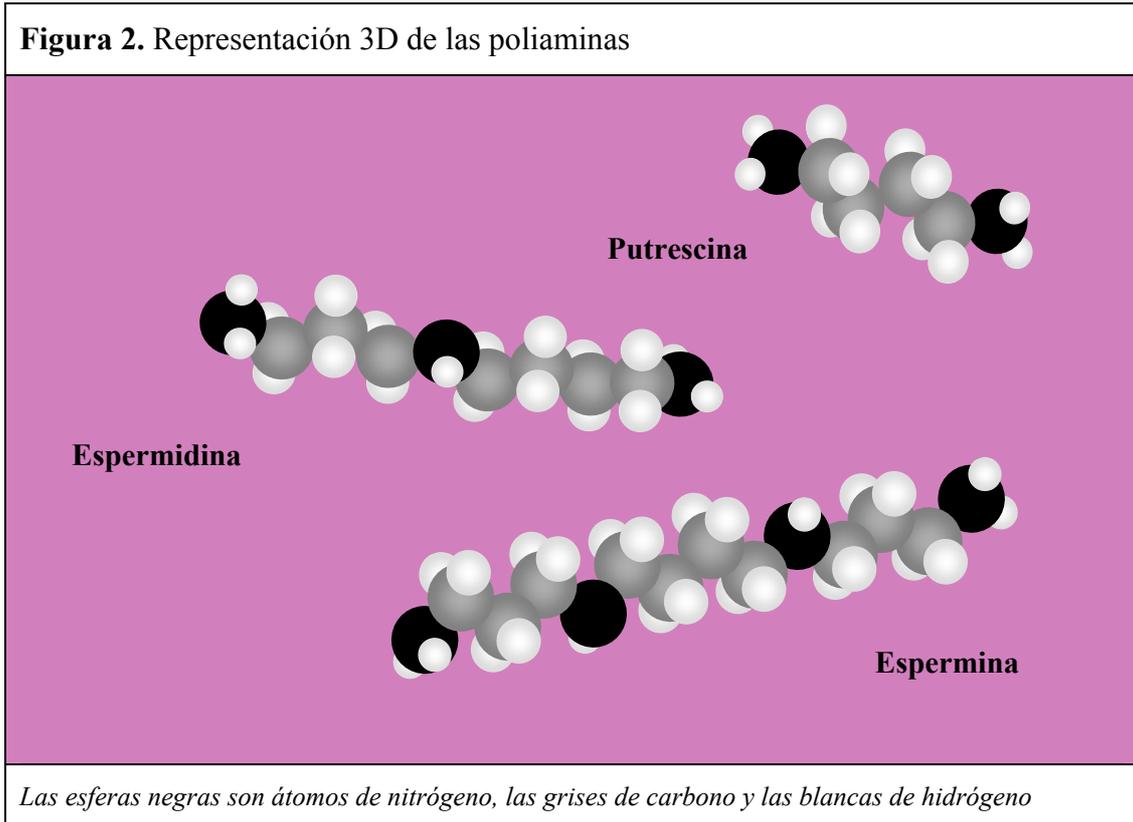
Las poliaminas se conocen clásicamente con el nombre de putrescina, espermidina y espermina. Recientemente una molécula llamada agmatina se ha identificado como una posible poliamina en animales y es considerada una amina biógena poco conocida hasta el momento. La agmatina era conocida en bacterias, plantas y algunos otros organismos, sin embargo, hace 3 o 4 años se descubrió la presencia de actividad arginina descarboxilasa (ADC) y agmatinasa en tejidos de mamíferos, concretamente en rata (Lortie *et al.*, 1996). La agmatina es una amina policatiónica que se sintetiza en las células por la descarboxilación de la L-arginina que fue originalmente identificada como un neurotransmisor (Reis & Regunathan, 2000). Otras aminas como la histamina y la cadaverina también aparecen de forma natural en las células vivas, pero no se incluyen normalmente dentro del término general de poliaminas, sino que son consideradas como aminas biógenas (Moinard *et al.*, 2005).

### 1.3 Estructura y propiedades

Las poliaminas son moléculas alifáticas con grupos amino distribuidos de forma regular a lo largo de su estructura (**Figura 2**). Su peso molecular es de 88 UMA para la putrescina, 145 UMA para la espermidina y 202 UMA para la espermina. La fórmula química de estas aminas es la siguiente:

Putrescina	$(^+H_3N-(CH_2)_4-NH_3^+)$
Espermidina	$(^+H_3N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH_3^+)$
Espermina	$(^+H_3N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_3^+)$

Las poliaminas forman puentes de hidrógeno con disolventes hidroxílicos como el agua y los alcoholes, y son solubles en ellos. A pH fisiológico las poliaminas están en estado policatiónico e interaccionan fuertemente con diferentes macromoléculas polianiónicas como el ADN y el ARN, quedando solamente del 7-10% del total del contenido celular de poliaminas en su forma libre.



Las poliaminas se diferencian de los cationes inorgánicos como el  $Mg^{2+}$  o el  $Ca^{2+}$  en que presentan un sistema de cargas (+) a distancias definidas y grupos alquílicos entre ellas capaces de establecer interacciones hidrofóbicas. Esto les permite formar interacciones más fuertes y más específicas que los cationes inorgánicos (para revisión sobre el tema ver Davis *et al.*, 1992; Marton & Pegg, 1995; Thomas & Thomas, 2001). Las cadenas de carbono que unen los grupos amonio son conformacionalmente flexibles y permiten a los N terminales situarse a distancias críticas. La presencia de dos átomos de N en mitad de la molécula hace de la espermina la molécula más flexible con una distancia relativa  $N_1-N_4$  que oscila entre 6 y 13,8 Å. En la espermidina la distancia  $N_1-N_3$  puede ser de 9 a 9,8 Å y la molécula es mucho menos rígida, mientras que la putrescina con una distancia fija entre  $N_1-N_2$  de 6,4 Å es completamente rígida (Dalla Via *et al.*, 1999). El grado de hidrofilia de las poliaminas viene determinado por la forma de la capa de agua que envuelve la estructura de la molécula y decrece en el orden espermina > espermidina > putrescina (Weiger *et al.*, 1998). La flexibilidad y el grado de hidratación de la molécula determinan la habilidad de las poliaminas para unirse a puntos de unión rígidos y/o flexibles de macromoléculas o estructuras celulares.

Las poliaminas circulan ligadas a estructuras de la membrana celular como los fosfolípidos, sobre todo de los eritrocitos. La reserva celular más importante está en el citosol y en el núcleo, en donde se cree que sirven para asegurar la transcripción del ADN y la traducción del ARN (Farriol *et al.*, 1999; Moinard *et al.*, 2005).

Se ha sugerido que las funciones de las poliaminas dependen de su carga eléctrica; la energía de unión a moléculas aniónicas disminuye de la espermina a la espermidina, y se ha visto que en el control de muchos procesos biológicos, la espermina es la más activa y la putrescina la menos (Moinard *et al.*, 2005). Además se ha visto que las poliaminas pueden modificar la respuesta inmune, bloquear los canales de iones de calcio de las membranas y regular la apoptosis celular. Estas funciones se comentan con mayor detalle a lo largo del capítulo.

#### **1.4 Determinación de poliaminas**

La determinación de poliaminas se realiza principalmente mediante técnicas de cromatografía líquida de HPLC, con un detector de fluorescencia, ya que se requiere una gran sensibilidad para detectar las concentraciones fisiológicas a las que se encuentran estas sustancias en los organismos. Previo a su inyección en el HPLC, las poliaminas han de ser derivatizadas, pudiendo prepararse varios tipos de derivados:

- Derivados dansílicos, ampliamente utilizados y que permiten detectar las poliaminas no sólo en su forma libre sino también acetilada (Teixeira *et al.*, 2002; Seiler, 1986).

- Derivatización en precolumna con oftaldehído (reactivo OPA) (van Eijk *et al.*, 1996). Esta técnica también se usa para la determinación de agmatina

- Reacción de derivatización con 6-Aminoquinolil-N-hidroxisuccinil carbamato (AccQ) (comercializado por Waters).

- Derivatización con cloruro de benzoilo, 9-Fluorenilcarbonil derivados, etc. (revisado por Seiler, 1986).

Las poliaminas también se pueden analizar por cromatografía gaseosa, aunque estos métodos son menos usados ya que los procesos de derivatización, purificación y separación de las poliaminas son complicados. No obstante, recientemente la American Oil Chemist's Society (A.O.A.C.) ha publicado un método oficial para análisis de putrescina y cadaverina en algunos alimentos (Rogers & Staruszkiewicz, 1997).

## 1.5 Fuentes de poliaminas

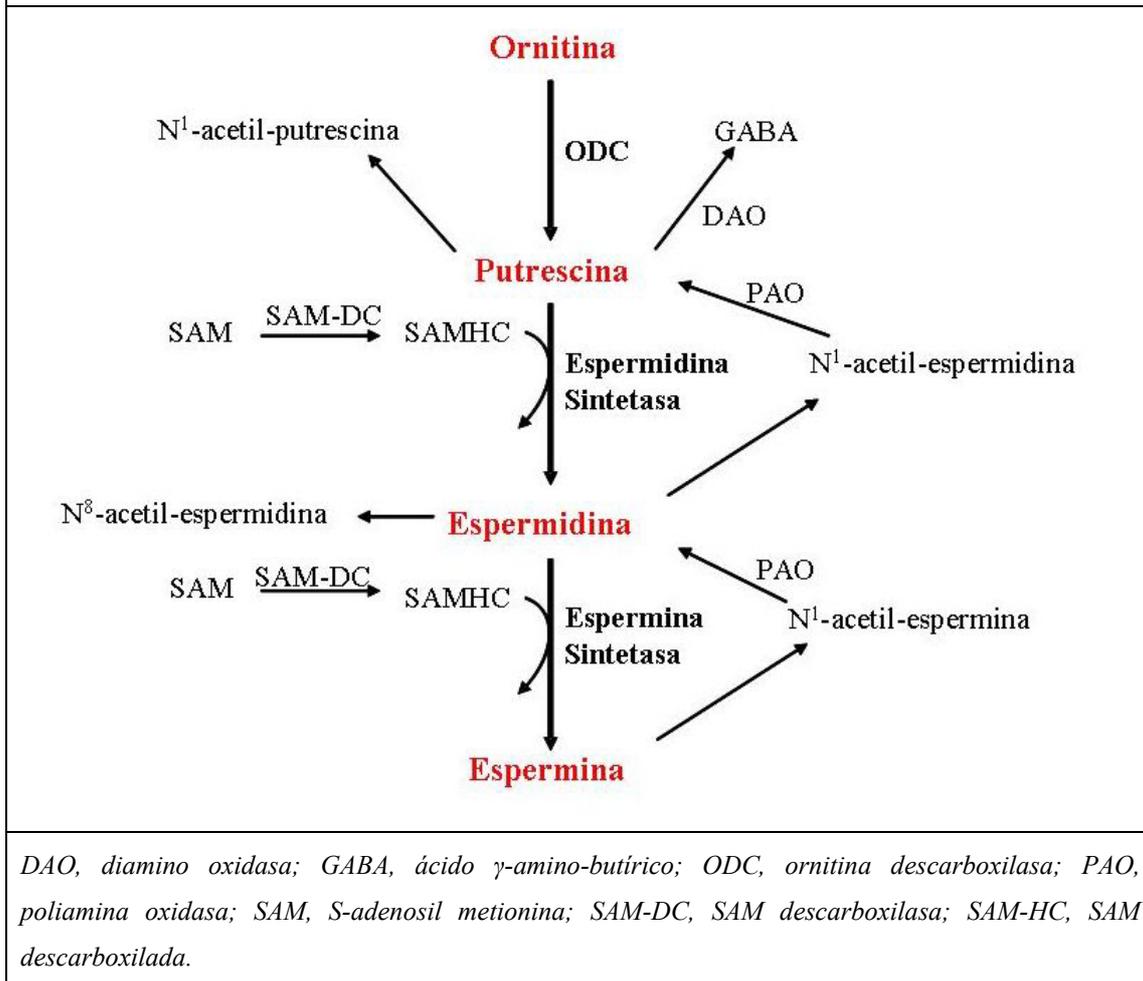
Las fuentes de poliaminas incluyen tanto las de tipo endógeno, entre las que se incluirían mecanismos de síntesis intracelular de novo y mecanismos de interconversión, como las exógenas, mediante absorción activa de la dieta y de las poliaminas producidas por las bacterias intestinales.

### 1.5.1 Poliaminas endógenas

La mayoría de las células de mamíferos tienen la capacidad de producir las poliaminas que necesitan. En los mamíferos, la biosíntesis de poliaminas se lleva a cabo a partir de ornitina. La ruta que conduce a la formación de putrescina es a través de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) (**Figura 3**) (Urdiales *et al.*, 2006).

La ornitina disponible para estas reacciones proviene del plasma. Además, la putrescina puede formarse dentro de las células por la acción de la arginasa (**Figura 4**). Es posible que esta enzima, ampliamente distribuida en los diferentes tejidos, se encuentre presente en los tejidos extrahepáticos para aportar ornitina a la biosíntesis de poliaminas. La función fisiológica tradicional de la arginasa es su participación en el ciclo de la urea (**Figura 4**)

La ODC es una enzima que depende de fosfato de piridoxal para su actividad. Se encuentra en niveles bajos en las células en estados fisiológicos de latencia. Su actividad puede elevarse varias veces como respuesta a diversos estímulos tróficos tales como hormonas, drogas, regeneración de tejido y factores de crecimiento (Yuan *et al.*, 2001).

**Figura 3.** Síntesis e interconversión de poliaminas

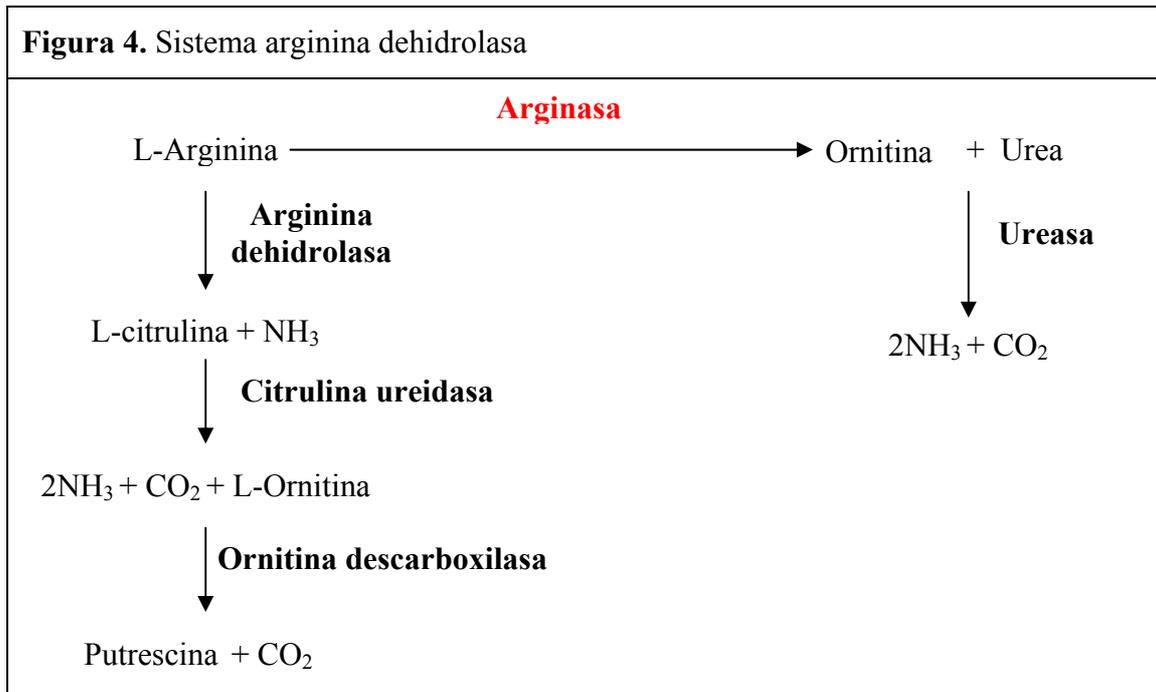
La putrescina es convertida en espermidina, por la adición de un grupo aminopropilo y la acción de la enzima espermidina sintetasa. Este grupo procede de la metionina, la cual primero es convertida en S-adenosil metionina (SAM) y luego descarboxilada enzimáticamente por la SAM-DC. La SAM-DC de los mamíferos es activada por putrescina e inhibida por espermidina y está presente en los tejidos en muy bajas concentraciones.

La espermidina es convertida a su vez en espermina por la espermina sintetasa y la adición de un segundo grupo propilamino. La concentración intracelular de poliaminas está críticamente regulada por la actividad de las enzimas ODC y SAM-DC.

Es importante mencionar que la acción de las enzimas espermidina sintasa y

espermina sintasa de incorporar los grupos propilamina para la síntesis de espermidina y espermina, respectivamente, a pesar de su similitud, tiene cierta especificidad por su propio sustrato. En el caso de la espermidina sintasa se ha observado que su actividad se incrementa en respuesta a hormonas, regeneración tisular y factores de crecimiento celulares.

**Figura 4.** Sistema arginina dehidrolasa



Las poliaminas, a su vez, se pueden interconvertir unas en otras mediante dos reacciones acopladas: una de acetilación, mediada por la acetil CoA:poliamina N'-acetil transferasa, y otra de rotura, mediada por una poliamina oxidasa (**Figura 3**) (Pegg & McCann, 1982). Las reacciones de acetilación suponen un mecanismo de control de los niveles celulares de poliaminas libres.

Por otra parte, la putrescina puede ser oxidada por la diamina oxidasa, produciendo  $\delta$ -aminobutiraldehído en lugar de convertirse a espermidina; este aldehído puede posteriormente ser oxidado a  $\gamma$ -aminobutirato (GABA), o dar origen a compuestos cíclicos. Pero la putrescina puede también ser acetilada por una enzima microsomal y la monoacetilputrescina ser oxidada por una monoamina oxidasa, para producir GABA, lo que ocurre en tejidos como el cerebro, que tienen baja actividad de diamina oxidasa. La acetilación de las poliaminas puede llevarse a cabo también por una

enzima nuclear que, con espermidina como sustrato, forma preferentemente N<sub>1</sub>-acetilespermidina. Las poliaminas acetiladas han sido encontradas en cantidades pequeñas en sangre y orina, pero no es clara la importancia de la acetilación en la excreción de estos compuestos.

Además, las poliaminas se originan a partir de los enterocitos exfoliados y éstos se han considerado como una posible fuente de poliaminas lumbales debido a su alto contenido celular en poliaminas (McCormack & Johnson, 1991).

### ***1.5.2 Poliaminas exógenas***

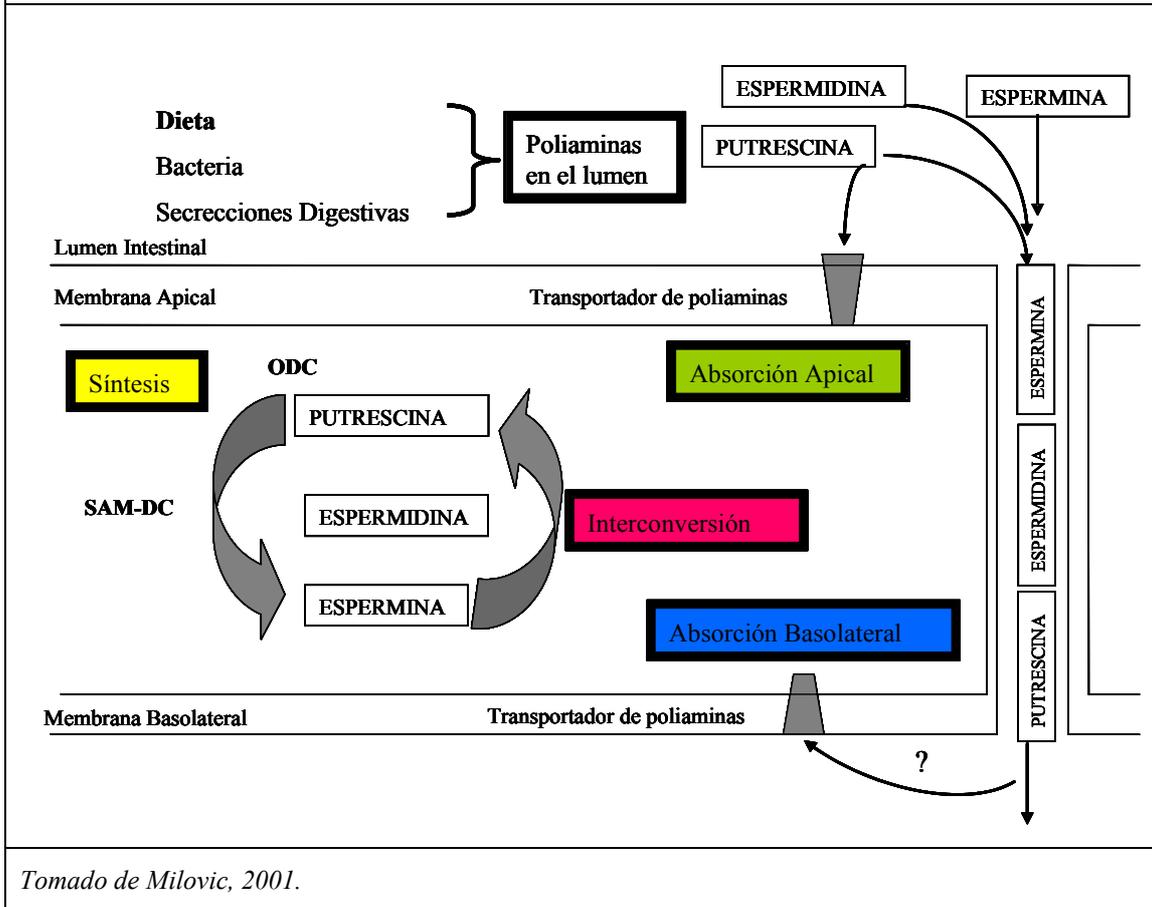
El aporte de poliaminas exógenas proviene fundamentalmente de la alimentación (especialmente de quesos, frutas y algunos vegetales), leche materna y fórmulas lácteas (Bardócz *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 1997; Farriol *et al.*, 1999). Las secreciones digestivas (especialmente intestinal y pancreática), los productos del catabolismo de las células intestinales y la flora bacteriana luminal, también contribuyen con gran cantidad de poliaminas al tracto intestinal (Buts, 1998).

## **1.6 Metabolismo de las poliaminas**

### ***1.6.1 Absorción***

Se estima que la dieta es la principal fuente de poliaminas en el lumen del intestino delgado. La absorción de poliaminas ocurre predominantemente en el duodeno y primeras porciones del yeyuno, siendo esta absorción rápida y completa. Las poliaminas son absorbidas por varios mecanismos que incluyen el uso de transportadores, así como absorción vía paracelular (Milovic, 2001; Chang, 1994); además, estos compuestos sufren una intensa metabolización antes de alcanzar la circulación sistémica (Milovic, 2001) (**Figura 5**).

**Figura 5.** Absorción y pool intracelular de poliaminas en los enterocitos



En sujetos que recibieron una perfusión continua de putrescina marcada con isótopos estables, se observó que el 60-80% de ésta desaparecía linealmente con el tiempo en el lumen intestinal; no obstante, en sangre se recuperaba sólo menos del 20% de la misma (Milovic *et al.*, 1997). En este experimento se observó un incremento sostenido en sangre de espermina y espermidina marcada, así como un incremento transitorio de putrescina acetilada, indicando que la putrescina del lumen intestinal se absorbía, y era inmediatamente metabolizada (en los propios enterocitos, hígado o ambos) recuperándose poco de ella intacta en plasma.

Algunos estudios *in vitro* han indicado que las poliaminas son absorbidas por los enterocitos mediante mecanismos saturables, tiempo y temperatura dependientes, pero sodio independientes. Este sistema de transporte parece poco específico para las diferentes poliaminas, aunque la información en humanos es limitada y no se ha

identificado el gen que codifica este transportador (Milovic, 2001). No obstante, parece que existen diferencias en los mecanismos competitivos para la acumulación de poliaminas no sólo en diferentes estirpes celulares del organismo, sino también en células con distinta ubicación en el tracto intestinal. Aminoácidos como glutamina, ornitina y ácido aspártico no tienen efecto competitivo a una concentración mM por el transporte de poliaminas, pero algunos derivados de las poliaminas como el 1,7-diaminoheptano o la agmatina, sí que interaccionan (Milovic, 2001).

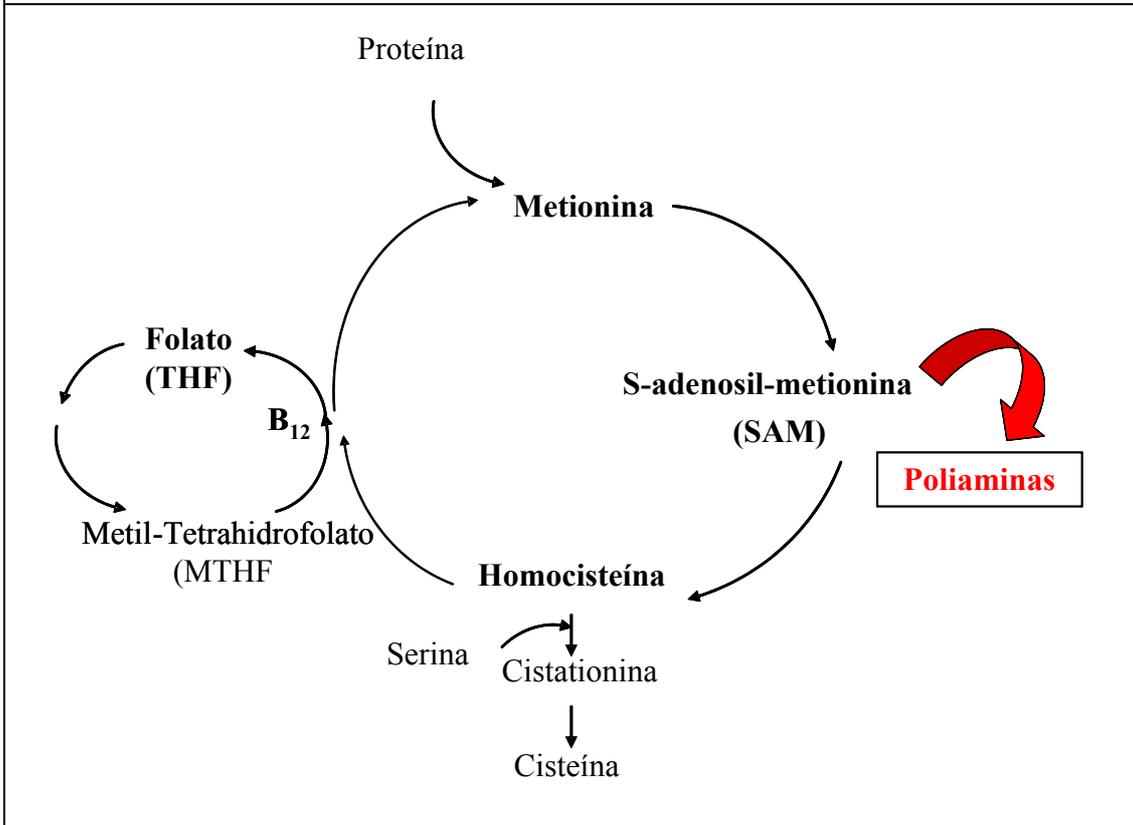
### **1.6.2 Metabolismo**

Las poliaminas que alcanzan la circulación son captadas prácticamente por todos los tejidos, siendo intestino, timo e hígado los que presentan las mayores cantidades de estos compuestos (Teixeira *et al.*, 2002; Bardócz *et al.*, 1995). La concentración de poliaminas en sangre es muy baja si se compara con la que se encuentra en los distintos órganos (Teixeira *et al.*, 2002; Bardócz *et al.*, 1995).

En los tejidos, las poliaminas pueden interconvertirse unas en otras, como hemos descrito anteriormente, e incluso acetilarse (**Figura 3**). Además, las células pueden sintetizar sus propias poliaminas a partir de la ornitina que es un compuesto activamente implicado en el ciclo de la urea en el hígado (**Figura 6**).

No obstante, la ODC, que es la primera enzima de la biosíntesis de poliaminas, es una enzima de vida corta, que está estrechamente regulada. La actividad ODC es inducida por muchos factores de crecimiento (Milovic *et al.*, 1995; Farriol *et al.*, 1999; Bauske *et al.*, 2000) y suprimida por inhibidores selectivos como la difluorometilornitina (DFMO) (Farriol *et al.*, 1999; Slotkin *et al.*, 2000) o mutaciones que disminuyen el crecimiento y la transformación celular de una forma sustancial en los animales. Por otra parte, la actividad ODC está regulada por las propias poliaminas vía mecanismos feed-back, mediante inhibición de la traducción del ARNm de la enzima, y además porque pueden elevar los niveles de una proteína inhibitoria o anti-enzima que se une a la ODC inactivándola (Farriol *et al.*, 1999).

**Figura 6.** Ciclo de la urea



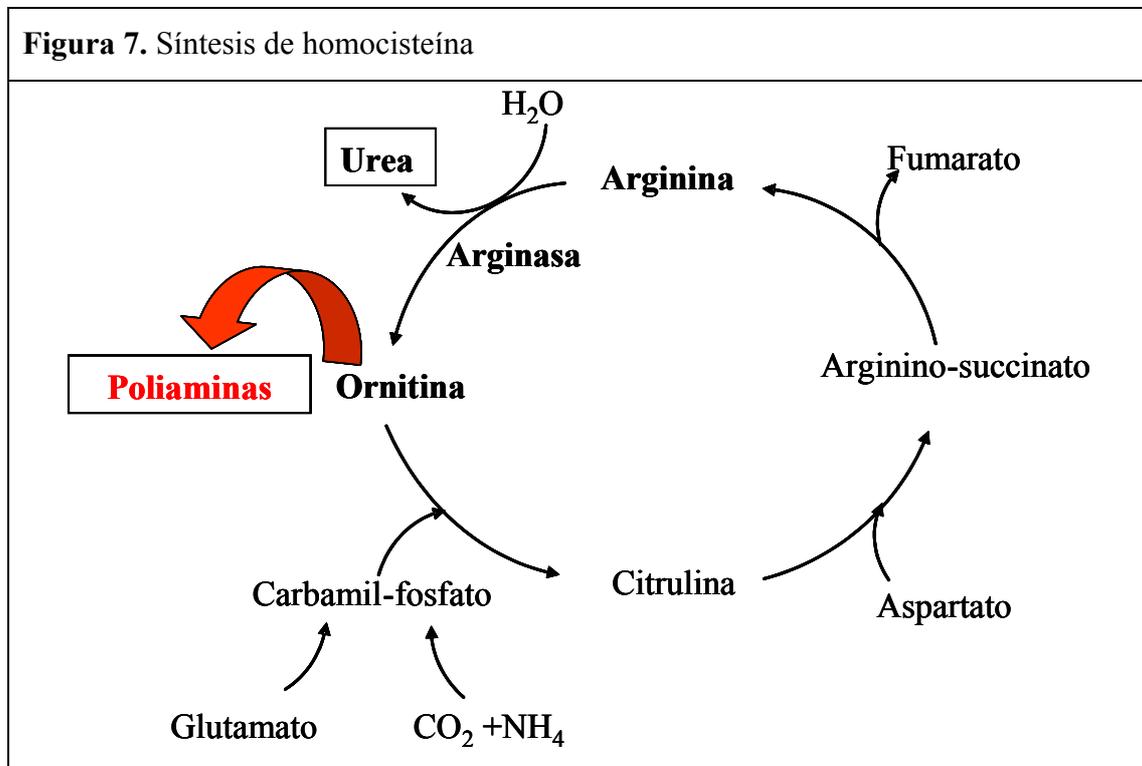
La arginina es un precursor de la síntesis de ornitina (y por ende de poliaminas), así como precursor también de otros muchos compuestos como son el óxido nítrico (NO) y la agmatina. Se ha descrito que restricciones de arginina en la dieta pueden originar un funcionamiento anormal del ciclo de la urea (**Figura 4**) (Teixeira *et al.*, 2002).

La arginina es un aminoácido que puede ser sintetizado endógenamente, pero que es esencial para el feto, neonato, pacientes sometidos a nutrición parenteral total y adultos con elevación de la degradación proteica como en la sepsis y los traumatismos (Barbul, 1986; Farriol *et al.*, 1999; Koletzko *et al.*, 1998). En ratones se ha observado que la suplementación de dietas con arginina hasta 2 g/100 g de dieta puede modificar los niveles de poliaminas de una forma órgano específica, pero no parece esencial para la homeostasis de las poliaminas en el ratón adulto (Teixeira *et al.*, 2002). No obstante, no se descarta que en situaciones de traumatismos, la arginina pudiera modificar más intensamente el metabolismo de las poliaminas, lo que permitiría de alguna manera

explicar los efectos beneficiosos que tiene este aminoácido en estas situaciones.

Se ha sugerido que la agmatina, producida por la descarboxilación de la arginina por la enzima arginina descarboxilasa (ADC), podría ser transformada en putrescina por una agmatinasa, lo que supondría una ruta alternativa en la formación de poliaminas (Moinard *et al.*, 2005). En bacterias estas rutas están claramente descritas (Roon & Barker, 1972; Simon, 1982; Tabor & Tabor, 1985; Arena & Manca de Nadra, 2001), pero en mamíferos los resultados son aún contradictorios y esta posible vía de formación de poliaminas no está aún claramente reconocida. Lo que sí se conoce es que la agmatina tiene un efecto supresor sobre la actividad ODC, y que interfiere con los transportadores de las poliaminas en las células (Satriano *et al.*, 1998; Mayeur *et al.*, 2005). La administración de agmatina a cultivos tumorales celulares produce supresión de la proliferación celular (Moinard *et al.*, 2005).

Otra vía metabólica relacionada con la síntesis de poliaminas está relacionada con el metabolismo de los folatos y la metionina (**Figura 7**).



A partir de metionina se puede formar SAM que es un precursor importante de espermidina y espermina. Varios estudios han mostrado que las concentraciones de SAM en el hígado están disminuidas en ratas sometidas a una deficiencia moderada de folato lo que podría resultar en una hipometilación del DNA con adversas consecuencias. Sin embargo, en estos animales con deficiencias moderadas de folato, se observa sorprendentemente un aumento de las concentraciones de espermidina y espermina en hígado y en mucho menor extensión en sangre, quizá por mecanismos compensatorios en la actividad ODC (Sun *et al.*, 2002).

### **1.6.3 Catabolismo**

La principal vía de catabolizar las poliaminas es por la desaminación oxidativa producida por una enzima, la diamino oxidasa (DAO), que está esencialmente en mucosa intestinal, hígado y riñones. Esta enzima puede actuar tanto sobre las poliaminas libres como sobre las formas acetiladas. En particular, la putrescina en su degradación es uno de los precursores del neurotransmisor GABA por varias reacciones iniciadas por la DAO.

Otra enzima, la poliamino oxidasa (PAO) también participa en el catabolismo de las poliaminas. Esta enzima es especialmente activa sobre espermina libre y sus formas acetiladas, y en menor proporción sobre la espermidina.

En la orina es posible detectar tanto las poliaminas mismas, como sus formas acetiladas y sus productos de oxidación (para los interesados en el catabolismo de las poliaminas se aconseja leer la revisión de Seiler *et al.*, 2004).

## **1.7 Funciones fisiológicas**

### **1.7.1 Efectos sobre la proliferación celular y la apoptosis**

La muerte celular programada o apoptosis y el crecimiento celular son dos caras de la misma moneda; las vías implicadas en su regulación se solapan parcialmente, y

una señal que induzca la proliferación celular en un tipo celular o estado fisiológico puede inducir la muerte por apoptosis en otras células o circunstancias. Por tanto, no resulta sorprendente que las poliaminas estén implicadas en el crecimiento celular y en la regulación de la apoptosis (para revisión del tema ver Schipper *et al.*, 2000) (**Tabla 1**).

Se ha demostrado en muchos sistemas celulares que las poliaminas son necesarias para el crecimiento óptimo. En la mayoría de las células esta necesidad es absoluta. En el hombre es ampliamente aceptado el importante papel de las poliaminas en los procesos de crecimiento y proliferación celular (**Tabla 1**). De hecho, es conocido que en las enfermedades hiperplásicas se produce un gran aumento de la actividad de la enzima ODC y de los niveles de poliaminas en los tejidos afectados, utilizándose su determinación como marcador de enfermedad neoplásica (Bachrach, 2004).

<b>Tabla 1.</b> Efectos biológicos de las poliaminas
<b>Poliaminas como factores de crecimiento</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ En microorganismos.</li> <li>▪ En células de mamífero.</li> </ul>
<b>Estabilización de membranas celulares</b>
<b>Estabilización de partículas subcelulares</b>
<b>Asociación con ácidos nucleicos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Estabilización del DNA contra la desnaturalización</li> <li>▪ Asociación con tRNA</li> <li>▪ Estabilización de la forma superenrollada del DNA</li> <li>▪ Empacamiento del DNA en bacteriófagos</li> <li>▪ Estimulación de la síntesis de DNA y RNA</li> <li>▪ Modificación de la actividad de ribonucleasas</li> </ul>
<b>Efectos sobre la síntesis de proteínas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fijación de las moléculas de tRNA a ribosomas</li> <li>▪ Estimulación de metilación de tRNA</li> </ul>

*Continúa tabla 1*

- Asociación con ribosomas
- Biogénesis de partículas ribosomales
- Fidelidad e iniciación de la traducción

**Efectos sobre varias reacciones metabólicas**

- Estimulación de nucleótido cinasas
- Modificación de las actividades de proteínas kinasas
- Incremento de la ADP-ribosilación de proteínas nucleares
- Activación de fosforilasa b
- Estimulación de lipólisis
- Activación de colina kinasa
- Incremento en la utilización de fructosa en espermatozoides (epidídimo)
- Inhibición de ATPasa

La elevada síntesis fetal de poliaminas durante la gestación, junto con las considerables y significativas variaciones de estas aminas durante los primeros días de vida en prematuros y niños nacidos a término, parece estar relacionado con su papel sobre el desarrollo y crecimiento celular en el organismo (Casti *et al.*, 1982; Casti *et al.*, 1985). La síntesis de poliaminas, especialmente de espermidina, aumenta además progresivamente en la glándula mamaria durante los períodos de gestación y lactancia (Russell & McVicker, 1972). A nivel sanguíneo, se observan mayores concentraciones de poliaminas durante las etapas de máximo desarrollo y luego decaen en el estado adulto.

En los mamíferos, incluyendo al hombre, la espermidina y la espermina están presentes en la mayor parte de los tejidos, en una concentración aproximada de 1 mM, mientras que la putrescina está generalmente presente en concentraciones bajas, excepto en tejidos que están estimulados en periodos de crecimiento o que tienen un compartimento celular proliferativo, como es el caso de la médula. Los patrones de acumulación de las poliaminas, espermidina y espermina y de su precursor putrescina, se han determinado durante el crecimiento y diferenciación de células normales y

neoplásicas, en cultivo y en tejidos de animales. Una relación espermidina-espermina menor de 1,0 es típica de tejidos con actividad biosintética baja o de tejidos diferenciados con una velocidad constante en la síntesis de RNA y de proteínas. Una relación mayor de 2,0, es típica de un tejido que presenta hipertrofia o hiperplasia. La concentración de espermina es mayor en tejidos diferenciados, disminuye durante los procesos de diferenciación, como en la regeneración del hígado, y es constante con la edad. Los niveles intracelulares de poliaminas, particularmente espermina y putrescina, aumentan espectacularmente con el crecimiento, tanto en células normales como neoplásicas (Méndez *et al.*, 2003).

Las poliaminas estabilizan las cargas negativas del DNA y de la estructura de la cromatina, y regulan diversos factores de transcripción del ARN y la síntesis proteica, lo que contribuye a la proliferación celular. Sin embargo, una acumulación excesiva de poliaminas favorece la apoptosis celular. Actualmente se cree que uno de los mecanismos responsables de los efectos de la excesiva acumulación de poliaminas sobre la apoptosis celular es el estrés oxidativo generado por la acumulación de peróxidos de hidrógeno durante el catabolismo de las poliaminas por la PAO (Moinard *et al.*, 2005; Hoet & Nemery, 2000). En el epitelio intestinal, la depleción de poliaminas con DFMO enlentece la apoptosis y se observa una reducción acoplada de la actividad PAO; en cambio, si en estas condiciones se añade un suplemento exógeno de putrescina o la inducción de un acúmulo intracelular de putrescina, en las células se restaura el proceso de apoptosis (Moinard *et al.*, 2005). Varios estudios en diferentes sistemas celulares han demostrado que la actividad de la ODC, enzima clave en la biosíntesis de poliaminas, aumenta de forma sensible y rápida después de la inducción de la apoptosis (Thomas & Thomas, 2001; Schipper *et al.*, 2000).

### ***1.7.2 Efectos sobre la maduración intestinal***

Es ampliamente aceptado en la literatura que la administración oral de poliaminas (especialmente espermina y espermidina) ha mostrado tener efectos de proliferación y maduración del tracto gastrointestinal en ratas neonatas, así como efectos tróficos en la mucosa intestinal de ratas adultas (Dufour *et al.*, 1988).

En mamíferos, el tracto gastrointestinal tiene que madurar durante los primeros meses de vida y adaptarse al cambio drástico de alimentación, de la leche a la comida sólida. La actividad de las enzimas localizadas en las membranas de los enterocitos se modifica con este cambio, y por ejemplo, la actividad lactasa disminuye en contraste con las actividades maltasa y sacarasa que aumentan; además, se han de producir cambios inmunológicos para adaptar el intestino a los nuevos contenidos microbianos y los nuevos nutrientes antigénicos. En ratas lactantes se ha demostrado que la administración oral de poliaminas, como la espermina o espermidina, puede inducir cambios en la actividad de distintas actividades enzimáticas implicadas en la maduración intestinal como la fosfatasa alcalina y actividades disacaridasas (Dandrifosse *et al.*, 2000; Peulen *et al.*, 2004; Peulen *et al.*, 2004). Esta maduración se ha visto disminuida en ratas que tenían disminuida su concentración de poliaminas en la mucosa intestinal, lo que confirma la relación entre las poliaminas y la maduración intestinal (Peulen *et al.*, 2004).

Durante el funcionamiento normal del intestino, los componentes de la dieta y los factores de crecimiento y hormonas segregados por el tracto gastrointestinal modulan las actividades del metabolismo de las poliaminas en la mucosa intestinal. A su vez, las poliaminas están involucradas en la reparación de la mucosa, la contractilidad muscular o la respuesta inmune/inflamatoria (Ter Steege *et al.*, 1997).

El metabolismo de las poliaminas en el tracto gastrointestinal parece estar íntimamente ligado a la proliferación celular de la mucosa (McCormack & Johnson, 1991). Las células en división de las criptas están expuestas a cuatro fuentes de poliaminas: (A) las células progenitoras contienen ODC y sintetizan poliaminas bajo el control de hormonas tróficas como la gastrina y factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico; (B) la luz intestinal contiene poliaminas que provienen de los alimentos y secreciones, y las sintetizadas por bacterias que son absorbidas por mecanismos de transporte específicos presentes en los enterocitos; (C) el aporte luminal se incrementa con las poliaminas presentes en las células maduras exfoliadas; (D) un efecto paracrino sobre la circulación local transporta las poliaminas absorbidas y sintetizadas por las células de las vellosidades a las células stem.

Por otra parte la exfoliación de las células promovida por estímulos físicos, y el aumento de la ODC en los enterocitos de las vellosidades, inducido por los nutrientes, forman un mecanismo de retroacción que iguala la velocidad de proliferación celular con la velocidad de pérdida de células en la mucosa. La integridad de la mucosa depende directamente del balance entre renovación y muerte celular. Uno de los aspectos específicos del metabolismo de las poliaminas en el intestino es la alta actividad DAO del tejido. La actividad crece progresivamente desde el estómago al íleon pero disminuye de nuevo en el colon. La enzima es sintetizada de forma masiva en los enterocitos y un 66% pasa a la lámina propia, donde queda unida a las células endoteliales de los capilares (Dowling, 1990).

Continua muy activo el estudio de las poliaminas en los cánceres gastrointestinales, particularmente en los tumores colorectales. Debido a la íntima asociación con la proliferación celular en los tejidos, se investiga la utilidad de diferentes variables relacionadas con las poliaminas como marcadores biológicos de riesgo (Wang *et al.*, 1996; Shigesawa *et al.*, 1998).

### ***1.7.3 Efectos sobre el sistema inmune***

La ingesta insuficiente de poliaminas podría tener un papel en la sensibilización a los alérgenos de la dieta. Las poliaminas están involucradas en la diferenciación de células inmunes y en la regulación de la respuesta inflamatoria.

En ratas lactantes se ha demostrado que la administración oral de espermina o espermidina puede inducir maduración intestinal temprana, acompañada de la modificación de los niveles de Ig A (Dandrifosse *et al.*, 2000). Ter Steege *et al.* (1997) observaron que después de la ingesta de espermina había un aumento en el porcentaje de linfocitos intraepiteliales que expresaban antígenos TCRab, CD4, CD5 y CD54, igual que ocurre con la maduración natural.

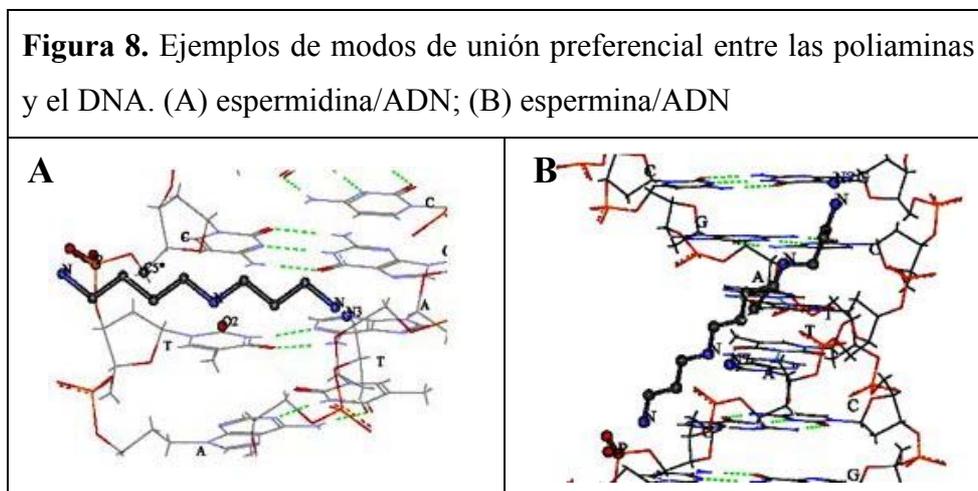
En situaciones de inflamación local, que curse con daños o muerte celular, la espermina favorece la migración y el crecimiento celular. En estos casos, las poliaminas actúan con un efecto de regulación negativo sobre la activación de los macrófagos con

complejas interacciones entre el metabolismo de NO y las poliaminas (Moinard *et al.*, 2005). Además se ha visto que las poliaminas pueden ejercer un efecto supresor sobre la respuesta inmunológica pulmonar y la respuesta inmunoalérgica intestinal (Moinard *et al.*, 2005).

Las concentraciones de espermina y la espermidina son generalmente más bajas en fórmulas infantiles que en leche materna. En humanos se ha estimado que la probabilidad de desarrollar alergia puede ser del 80% en el lactante si la concentración de espermina en la leche es menor a 2 nmol/ml de leche, y alrededor de un 0% si fuera mayor a 13 nmol/ml de leche (Dandrifosse *et al.*, 2000).

#### 1.7.4 Interacción con el ADN

La característica individual más importante de las poliaminas es, seguramente, su capacidad de unión a los ácidos nucleicos, en particular al ADN (**Figura 8**).



Hay una interacción coulombica muy fuerte en fase acuosa entre las poliaminas y el ADN, de forma que estos cationes son atraídos por el ADN desde distancias muy lejanas y, una vez cerca de él permanecen ahí por largos periodos de tiempo (Symons, 1995). Las poliaminas neutralizan las cargas de los grupos fosfato del ADN, interaccionan con las bases del ácido nucleico y se acoplan dentro de los surcos de la

doble hélice (Feurerstein *et al.*, 1990; Feuerstein *et al.*, 1991). Estas interacciones incrementan la temperatura de fusión del ADN de forma dosis-dependiente (Thomas & Bloomfield, 1984). Los incrementos son del orden de 10-20°C a concentraciones fisiológicas de espermina lo que sugiere un papel significativo de las poliaminas en la estabilización de la estructura del ADN *in vivo*. Estudios inmunocitoquímicos han demostrado que la espermidina y la espermina se asocian con cromosomas mitóticos altamente compactados (Hougaard *et al.*, 1987; Sauve *et al.*, 1999), por lo que su efecto en la estructura de la cromatina podría ser más estabilizador que regulador (Laitinen *et al.*, 1998). Las poliaminas también tienen la capacidad de inducir cambios conformacionales en el ADN. Su unión puede promover la conversión de la forma diestra (ADN-B) a la siniestra (ADN-Z) (Thomas *et al.*, 1991; Bancroft *et al.*, 1994), o a una forma alternativa de helice diestra, la ADN-A (Jein *et al.*, 1989). No obstante, las poliaminas también se unen al ADN-B sin que se detecte ningún cambio en la estructura secundaria del ácido nucleico por espectroscopía Raman (Deng *et al.*, 2000). La forma ADN-Z está involucrada en el control de la transcripción y es inducida por las poliaminas principalmente en bloques de secuencias alternas de purinas-pirimidinas (Herbert & Rich, 1999). Otro mecanismo potencial de regulación de la transcripción por las poliaminas es la torsión que inducen en la molécula de ADN cuando se unen a su surco mayor (Feurerstein *et al.*, 1986; Feuerstein *et al.*, 1989). Las poliaminas promueven esta torsión neutralizando las cargas negativas de los fosfatos del ADN y reduciendo los requerimientos de energía para doblar la macromolécula.

## 1.8 Contenido de poliaminas en los alimentos

La dieta de un adulto normal contiene del orden de varios micromoles de poliaminas al día (Bardócz *et al.*, 1995; Farriol *et al.*, 2004). El contenido de poliaminas en los alimentos es muy variable, oscilando desde unos pocos nanomoles a unos pocos micromoles por gramo; además, la distribución de las distintas poliaminas es diferente según el tipo de alimento (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Contenido en poliaminas en frutas, verduras y otros alimentos ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ).

<b>ALIMENTO</b>	<b>PUTRESCINA</b>	<b>ESPERMIDINA</b>	<b>ESPERMINA</b>
Maíz	980	240	-
Naranjas	1330	13	8
Mandarina	13	18	2
Melocotón lata	13	15	1
Peras	268	208	40
Peras en lata	10	21	2
Uvas	9	6	2
Uvas pasas	11	9	22
Pomelo	18	0	9
Col	4	22	16
Cebolla	62	38	4
Patatas	229	101	24
Lentejas	38	148	34
Champiñones	1	236	4
Zanahoria	14	53	10
Coliflor	35	150	48
Lechuga	37	29	-
Tomate	106	11	-
Pepino	36	10	1
Rabano	2	3	6
Alubias rojas	4	131	113
Judías verdes	49	53	23
Guisantes	61	428	166

*Continúa tabla 2*

<b>ALIMENTO</b>	<b>PUTRESCINA</b>	<b>ESPERMIDINA</b>	<b>ESPERMINA</b>
Manzana	5	15	-
Pan integral	6	147	35
Pan blanco	17	57	17
Pasta	11	48	52
Arroz	11	9	40
Galletas	8	0	7
Cereales	23	166	30
Patatas fritas	245	171	18
Patatas chips	240	164	12
Anacardos	184	262	271
Huevo	5	10	5
Yogurt	9	7	6
Flan	3	0	0
Cerveza	54	5	-
Vino tinto	33	5	-
Vino tinto francés	104	11	6
Té (infusión)	0	1,5	0

*Tomado de Farriol et al., 2004.*

Entre los alimentos que contienen poliaminas hay tanto de origen vegetal (frutas y verduras), como de origen animal (leche, huevos, carne y pescado). Las poliaminas dominantes en los vegetales son la putrescina y la espermidina. Las setas contienen gran cantidad de espermidina, las naranjas de putrescina mientras que las hojas de té contienen las tres poliaminas en gran cantidad. La carne roja contiene mayoritariamente

espermina. La leche y los huevos contienen proporcionalmente menos cantidades. La poliamina predominante en la leche es la espermidina, mientras que los derivados como el queso o provenientes de la fermentación microbiana contienen mayor cantidad de putrescina y espermidina (Farriol *et al.*, 1999; Farriol *et al.*, 2004). La leche materna es la principal fuente de poliaminas en el recién nacido (Moinard *et al.*, 2005).

### 1.9 Poliaminas en la leche materna y su papel en el neonato

La leche humana contiene niveles de poliaminas mayores que las fórmulas infantiles. La cantidad de poliaminas presente en la leche materna depende, entre otros factores, de la dieta y de la capacidad de estos componentes de ser secretados desde el epitelio de la glándula mamaria. Se ha postulado que los bajos niveles de poliaminas encontrados en la leche materna de madres atópicas se debe a diferencias en el metabolismo de estos compuestos en las mismas (Duchen & Thorell, 1999). La leche materna contiene cantidades importantes de poliaminas, principalmente espermina y espermidina, y mucha menos putrescina. Los niveles de poliaminas detectados en leche humana presentan variaciones según los distintos trabajos (**Tabla 3**).

<b>Tabla 3.</b> Concentraciones de poliaminas en leche materna humana.			
	<b>Pollack <i>et al.</i> 1992</b>	<b>Romain <i>et al.</i> 1992</b>	<b>Buts <i>et al.</i> 1995</b>
<b>Putrescina</b>	0-61 nmoles/dL (0-50 ppb)	129 ± 21 nmoles/dL (110 ± 20 ppb)	24 ± 3.5 nmoles/dL (20 ± 3 ppb)
<b>Espermidina</b>	73-351 nmoles/dL (100-500 ppb)	711 ± 109 nmoles/dL (1000 ± 160 ppb)	220 ± 20 nmoles/dL (300 ± 30 ppb)
<b>Espermina</b>	72-445 nmoles/dL (150-900 ppb)	663 ± 136 nmoles/dL (1300 ± 270 ppb)	313 ± 16 nmoles/dL (630 ± 30 ppb)

Buts *et al.* (1995) cuantificaron en leche materna los niveles de espermina > espermidina > putrescina; en cambio, Pollack *et al.* (1992) y Duchen & Thorell (1999)

encontraron que espermidina > espermina > putrescina. Suponiendo en el lactante un consumo de 600-700 ml de leche humana al día, Buts *et al.* (1995) estimaron que el consumo diario de poliaminas en estos niños sería de unos 3,5  $\mu\text{mol}/\text{día}$ .

El contenido de poliaminas varía además con los días de lactancia. En general, los niveles de putrescina en la leche materna varían muy poco con el período de lactancia, mientras que los de espermina y espermidina aumentan alrededor de 10 veces desde el nivel detectado en el día 1 de lactación (Romain *et al.*, 1992; Buts *et al.*, 1995). Los mayores niveles de espermina y espermidina en leche materna son encontrados en la 1<sup>a</sup> semana de lactación, lo que suscita la cuestión del impacto fisiológico de estas sustancias en el neonato (Romain *et al.*, 1992; Buts *et al.*, 1995). Posteriormente los niveles de estas poliaminas van declinando y se hacen relativamente constantes hasta la edad adulta.

Todos estos resultados han suscitado el interés por la adición de estos compuestos a las fórmulas infantiles, sobre todo a las fórmulas de iniciación, en las que los niveles detectados de estas poliaminas eran menores que los de la leche materna. En algunas fórmulas de inicio y continuación analizadas, los niveles de putrescina eran similares a los de leche humana, pero los de espermina y espermidina eran menores (Buts *et al.*, 1995). En algunas fórmulas especiales elaboradas con proteínas hidrolizadas, los niveles de espermidina y espermina eran significativamente muy superiores a los de leche materna (Buts *et al.*, 1995).

El estudio en niños de los niveles de excreción de poliaminas en heces muestra un valor de excreción de putrescina muy superior al ingerido, lo que sugiere que tenga un origen bacteriano (Forget *et al.*, 1997). Además, niños con problemas de mal absorción de nutrientes presentan en heces unos altísimos niveles de putrescina y cadaverina, lo que ratifica esta idea; los nutrientes mal absorbidos alcanzarían el colon donde podrían ser fermentados. La síntesis procariótica de cadaverina desde lisina, y de putrescina desde arginina ha sido bien descrita, mientras que muchos procariotas no poseen las enzimas espermina y espermidina sintetasas para dar espermina y espermidina. La putrescina podría tener pues indirectamente un gran papel regenerador del epitelio intestinal en estos niños (Forget *et al.*, 1997).

La importancia de la concentración de poliaminas en la leche materna durante la primera semana de lactación nos lleva a la pregunta de cuál será el impacto fisiológico de estas sustancias sobre el neonato. Ha sido postulado que la administración de poliaminas en la leche materna podría favorecer la maduración intestinal y prevenir las alergias alimentarias en los niños lactantes, por disminución de la permeabilidad a proteínas antigénicas (Duchen & Thorell, 1999). No obstante, no existen aún grandes evidencias de que los niveles de poliaminas encontrados hasta ahora en este fluido fisiológico sean suficientes para producir estos efectos biológicos en humanos. La permeabilidad intestinal a macromoléculas es menor en niños prematuros alimentados con leche materna que en alimentados a base de fórmulas lácteas, y esta diferencia desaparece si las fórmulas son suplementadas en poliaminas (Dandrifosse *et al.*, 2000). Duchén & Thorell (1999) encontraron que los niveles de putrescina y espermina eran significativamente menores en leche materna de madres atópicas que en no atópicas, pero que no se correlacionaban con el desarrollo de atopía en los niños. Así pues, aunque estos resultados son favorables, más estudios son necesarios para confirmar este papel preventivo de las poliaminas en los procesos de alergias alimentarias en lactantes.

### **1.10 Nuevos avances en la aplicación de las poliaminas**

El posible empleo terapéutico de las poliaminas de la dieta suscita gran interés. Sin embargo, hay una gran falta de información en este campo que contrasta con la alta cantidad de trabajos y revisiones sobre el metabolismo de estas sustancias.

La combinación de tratamientos farmacológicos con difluorometilornitina (DFMO), inhibidores de la ornitina descarboxilasa, neomicina y dietas exentas de poliaminas puede ser crucial en la disminución del tamaño de tumores (Bachrach, 2004). Por el contrario, dietas muy seleccionadas y con alto contenido en poliaminas pueden tener un papel decisivo en la recuperación de la flora y de la mucosa intestinal, influyendo en todos los procesos de reparación tisular a nivel de toda la longitud del intestino delgado u órganos adyacentes.

La administración de espermidina podría mejorar la respuesta del organismo en situaciones de traumatismos. En animales, se ha observado que el aporte diario

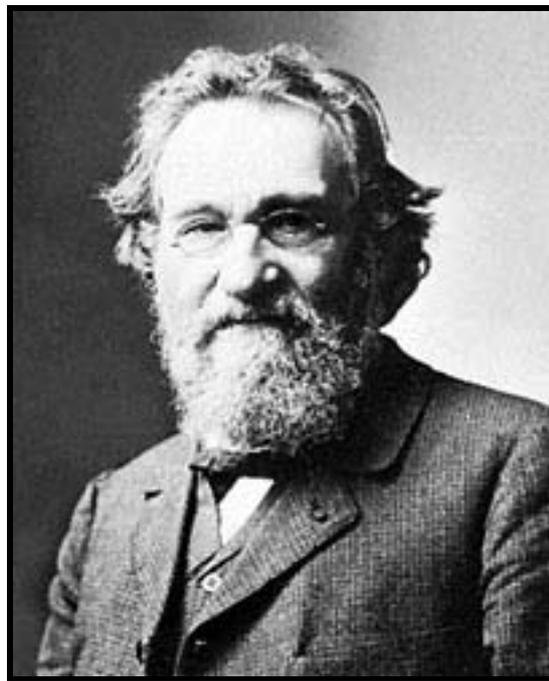
moderado del orden de 0,05% del nitrógeno total (dosis consideradas como no tóxicas) de espermidina, incrementaría la eficacia del aporte proteico disminuyendo la depleción de glutamina.

Es conocido, que la flora intestinal es una fuente importante de poliaminas para el organismo. En determinadas situaciones, el sobrecrecimiento microbiano de algunas cepas no tendría por qué ser interpretado como un hecho totalmente negativo, sino que podría jugar un papel compensatorio natural en la adaptación del intestino a situaciones que requieran una restitución del enterocito. Sería interesante tener un mejor conocimiento del tipo de poliaminas que seleccionan las distintas cepas bacterianas y como afectan a las distintas enfermedades inflamatorias intestinales tales como enfermedad de Crohn y otras.

La ingeniería genética ofrece la posibilidad de obtener, mediante cultivos especiales, alimentos carentes o ricos en poliaminas, y ya se tienen noticias de la obtención de patatas transgénicas con alto contenido de espermidina (Farriol *et al.*, 2000). No obstante, se necesitan más estudios sobre el efecto terapéutico y nutricional de estas sustancias que están tan estrictamente reguladas por el organismo, antes de recomendar el uso de suplementos o enriquecimientos en las mismas.



# *Fructooligosacáridos*



Ellí Metchnikoff (1907)

Estudió la relación entre la flora intestinal y la salud humana



## 2. OLIGOSACÁRIDOS

Los oligosacáridos presentes en la dieta difieren unos de otros en su estructura química, variando en el número (de 2 a 20) de moléculas de hexosa (glucosa, fructosa, galactosa, xilosa); y en la posición y conformación ( $\beta$ - v.  $\alpha$ -) entre las moléculas de hexosa. Todas estas características químicas no solo tienen consecuencias sobre las propiedades fisiológicas de los oligosacáridos y por tanto en su utilidad como sustancias alimentarias, sino que también van a influir en el tracto gastrointestinal.

Existen fuentes naturales de oligosacáridos tales como los galactooligosacaridos de la leche materna, los fructanos de la cebolla (*Allium cepa*), puerros (*Allium porrum*), y ajo (*Allium sativum*) ó la estaquiosa de la soja; no obstante, debido a su interés nutricional, la biotecnología (procesos enzimáticos o térmicos) ha sido aplicada para obtener nuevos tipos de oligosacáridos, por síntesis enzimática a partir de azúcares simples o mediante hidrólisis enzimática a partir de carbohidratos más complejos (**Tabla 4**) (Delzenne, 2003; Murphy, 2001).

<b>Tabla 4.</b> Oligosacáridos bifidogénicos para industria alimentaria		
<i>Tipo de oligosacáridos</i>	<i>Sustrato</i>	<i>Tratamiento químico o enzimático</i>
Fructo-oligosacáridos	Sacarosa Inulina	$\beta$ -fructo-furanosidasa $\beta$ -fructosil-transferasa Inulinasa
$\beta$ -galacto-oligosacáridos	Lactosa	$\beta$ -1,6-galactosidasa
Lactulosa	Lactosa	Alcali
Lactosacarosa	Lactosa y sacarosa	$\beta$ -fructo-furanosidasa
Oligosacáridos de palatinosa	Sacarosa	Sintetasa de isomaltulosa
Xilo-oligosacaridos	Xilano	$\beta$ -1,4-endo-xilanasa
Isomalto-oligosacáridos	Almidón	$\alpha$ -amilasa, $\beta$ -amilasa
Gentio-oligosacáridos	Almidón	Hidrólisis ácida o enzimática y transglucosilación

Los oligosacáridos también pueden ser añadidos a los alimentos debido a sus propiedades nutricionales o sus características organolépticas. La ingesta de oligosacáridos es difícil de calcular, pero puede llegar a 3-13 g/día por persona (para fructooligosacáridos), en función de la población. El grado de resistencia a las reacciones enzimáticas que ocurren en la parte superior del tracto gastrointestinal permite a los oligosacáridos convertirse en nutrientes para el colon, ya que algunas especies bacterianas intestinales expresan hidrolasas específicas y son capaces de convertir los oligosacáridos en ácidos grasos de cadena corta (acetato, lactato, propionato, butirato) y/o gases derivados de la fermentación. Los datos experimentales obtenidos *in vitro* e *in vivo* en animales, así como los últimos datos obtenidos en seres humanos, confirman el papel de los oligosacáridos de la dieta en los procesos fisiológicos en los diferentes tipos de células intestinales (producción de mucinas, división celular, función de las células inmunes, transporte iónico) y también células fuera del tracto gastrointestinal (producción de hormonas, metabolismo de lípidos y carbohidratos).

Los fructooligosacáridos (FOS) son los oligosacáridos no digeribles más extensamente estudiados en términos de sus propiedades prebióticas (Murphy, 2001) (Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001) y a continuación vamos a centrarnos en este tipo de oligosacáridos.

### **3. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS**

#### **3.1 Propiedades de los fructooligosacáridos**

##### ***3.1.1. Estructura química y producción***

Los FOS son carbohidratos de reserva que se encuentran en alimentos tales como la cebolla, espárragos, alcachofas, ajo, trigo, tomates, plátano y miel. Su estructura química consiste en una cadena de unidades de fructosa con una unidad de glucosa terminal unidas por enlace glucosídico  $\beta(2\rightarrow1)$ , característica que los define como

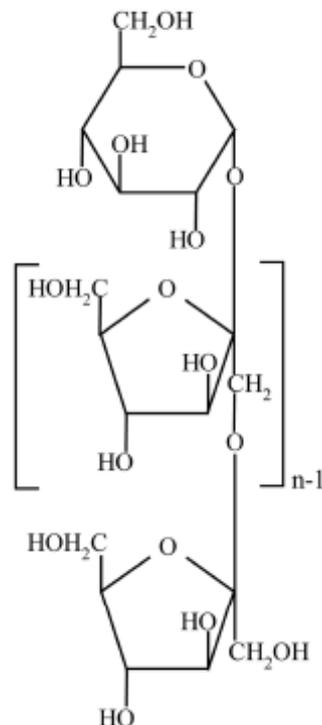
oligosacáridos no digestibles (NDO), que hace que no puedan ser degradados por las enzimas digestivas humanas que son específicas para uniones  $\alpha$ -glucosídicas. De tal forma que todos los NDO pueden actuar como sustratos para la fermentación bacteriana, aportando energía para el crecimiento microbiano. La longitud de la cadena puede variar entre 2 y 60 unidades.

Existen tres categorías de FOS que tienen diferencias estructurales:

### Inulina

Es un fructooligosacárido con grado de polimerización de 2 a 60 monómeros de fructosa, con un grado de polimerización medio de 12 (**Figura 9**).

**Figura 9.** Estructura química de los fructooligosacáridos



$n =$  número de unidades de fructosa (inulina,  $n=2-60$ ; oligofructosa,  $n=2-20$ ). (Murphy, 2001)

Ha sido definida como un carbohidrato polidisperso, constituido principalmente, si no exclusivamente, de enlaces  $\beta$ -1,2-fructosil-fructosa. La inulina se puede obtener de

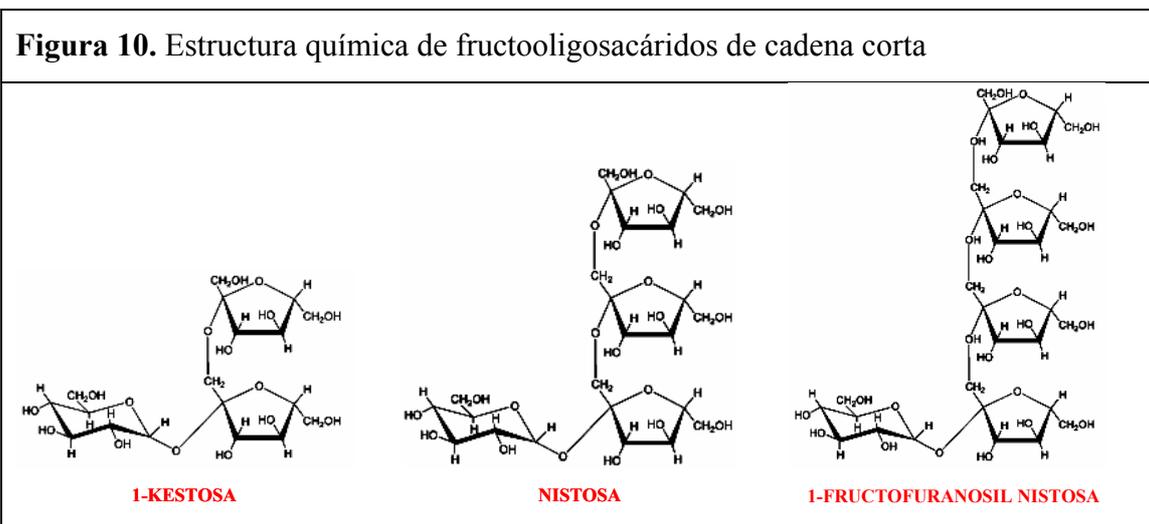
varias plantas de familias mono y dicotiledóneas (Liliaceae, Amarillaceae, Gramínea y Compositae). Sin embargo, solo una especie vegetal (achicoria, *Chicorium intybus*) es utilizada para producir inulina a nivel industrial. El proceso de obtención de inulina es similar al que se utiliza para la obtención del azúcar de la remolacha azucarera. La inulina nativa es procesada y transformada en fructanos o fructooligosacáridos de cadena corta (scFOS) con un grado de polimerización de entre 2 y 10 (normalmente 5) como resultado de la hidrólisis enzimática parcial con inulinasa.

### Oligofructosa

Es definida como una fracción de oligosacáridos con grado de polimerización menor de 20, aunque los productos comerciales suelen tener un valor medio de nueve. Es producida por la hidrólisis enzimática de la inulina y consiste en una mezcla de cadenas frutosil, con glucosa y fructosa terminales (**Figura 9**).

### Fructooligosacáridos de cadena corta

Están específicamente definidos como una mezcla de cadenas frutosil con una unidad terminal de glucosa con un máximo de 5 unidades (**Figura 10**).



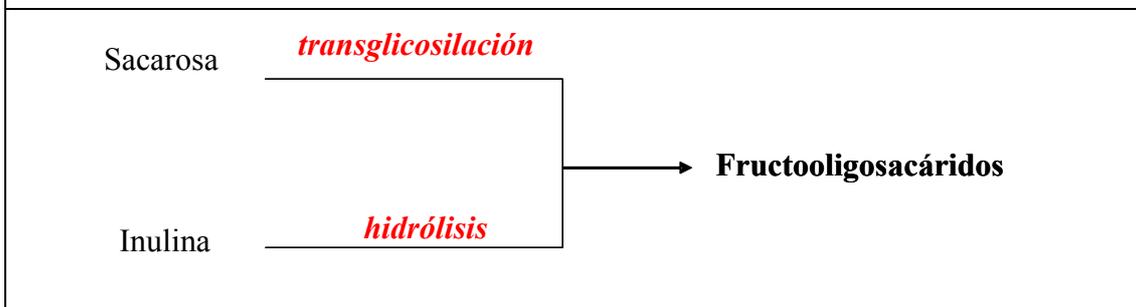
Los fructooligosacáridos de cadena corta (scFOS) constan estructuralmente de una molécula de sacarosa a la que se pueden unir por enlaces glicosídicos  $\beta(2-1)$  de 1 a 3 moléculas de fructosa dando lugar respectivamente a los fructooligosacáridos: 1-

kestosa (GF2), nistosa (GF3) y 1-fructofuranosil-nistosa (GF4) (Roberfroid & Delzenne, 1998) (Figura 10). La kestosa se forma por la adición de una molécula de sacarosa a una de fructosa. La nistosa se forma por la posterior adición de una molécula de fructosa. La adición de otra molécula de fructosa dará lugar a la formación de fructofuranosil-nistosa (Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001).

Los FOS son producidos a partir de la hidrólisis parcial de la inulina extraída de la raíz de la achicoria por acción de enzimas fúngicas sobre los oligosacáridos que conforman la inulina, para obtener un producto comercial.

Los FOS pueden ser obtenidos por dos procesos diferentes dando lugar a productos finales ligeramente diferentes. En el primer método, los FOS se producen a partir de la sacarosa usando la actividad de transfructosilación de la enzima  $\beta$ -fructofuranosidasa y el fructooligosacárido formado tiene entre 2 y 4 unidades fructosil- $\beta(2-1)$  unidas a un residuo terminal de  $\alpha$ -D-glucosa. El segundo método, usado para la producción de FOS, es la hidrólisis enzimática controlada de la inulina. En este caso no todas las cadenas fructosil  $\beta(2-1)$  acaban en una glucosa terminal y la mezcla de oligosacáridos producida contiene cadenas de fructo-oligómeros más largas que las producidas por el proceso de transfructosilación de la sacarosa (Crittenden & Playne, 1996) (Figura 11).

**Figura 11.** Representación esquemática de los procesos de producción de los fructooligosacáridos



### 3.1.2 Cuantificación de los FOS

En las últimas décadas se han descrito varios métodos para el análisis de los oligosacáridos no-digeribles (NDOs). La mayoría de ellos analizan los oligosacáridos por cromatografía de gas-líquido (Englyst *et al.*, 1994) o por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Collins & Chandorkar, 1971).

Los primeros métodos de HPLC se basaban en la separación de NDOs hasta un grado de polimerización de 15, mediante columnas de intercambio iónico de baja presión o de impregnación (Swennen *et al.*, 2006; White *et al.*, 1980). Los FOS y los azúcares libres son fácilmente separados en una columna de intercambio iónico (por ejemplo, HPX-87C, Biorad, Richmond, VA, USA) que se coloca unida a un detector de índice refractario. La temperatura de la columna se mantiene constante a 85°C, usándose agua como fase móvil a una tasa de flujo de 0,6 ml/min.

La cromatografía de capa fina (TLC) se puede usar para la identificación de FOS de sacarosa, fructosa y glucosa (Yun, 1996). El sistema de TCL para la determinación de FOS fue descrito por Collins y Chandorkar en 1971. Debido a que estos métodos requieren largos tiempos de análisis, se han desarrollado métodos alternativos como la cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPAEC) que a pH elevado (pH~12) y combinada con la detección amperimétrica pulsada (PAD) (Kabel *et al.*, 2002; Gelders *et al.*, 2003; Swennen *et al.*, 2006) son útiles para la separación de una gran variedad de NDOs. Una ventaja de HPAEC-PAD es la separación y la detección más eficientes que por HPLC. Además, también reducen al mínimo la preparación de la muestra (Mou *et al.*, 1991).

No obstante, la identificación de mezclas complejas de oligosacáridos sigue siendo difícil, por lo que, la caracterización por parte de las enzimas específicas (Mutter *et al.*, 1998), los análisis de metilación (Ciucanu & Kerek, 1984), la espectrometría de masas (MS), y/o la resonancia magnética nuclear (NMR) se utilizan para revelar la estructura exacta de los FOS (Swennen *et al.*, 2006).

### 3.1.3 Propiedades fisicoquímicas

Los FOS son compuestos solubles en agua y su dulzor oscila de 0,3-0,6 veces al de la sacarosa, dependiendo de la estructura química y el grado de polimerización de los oligosacáridos (Crittenden & Playne, 1996; Yun, 1996). El dulzor disminuye con la longitud de la cadena de oligosacáridos. Esta propiedad hace que los FOS sean muy usados en comidas donde el uso de la sacarosa está restringido por su alta capacidad edulcorante.

Los FOS son altamente higroscópicos y su capacidad de retención del agua es mayor que la de la sacarosa e igual a la del sorbitol (Bornet, 1994; Yun, 1996); es difícil mantener el producto liofilizado estable bajo condiciones atmosféricas durante periodos prolongados (**Tabla 5**).

<b>Tabla 5.</b> Propiedades funcionales de los azúcares no digeribles						
Azúcar no digerible	Dulzor (sacarosa=1)	Sabor del azúcar seco	Estabilidad		Viscosidad	Higroscopicidad
			Calor (°C)	pH		
Sorbitol	0,70	Frío	< 160	2-10	Baja	Alta
Xilitol	0,90	Muy frío	< 160	2-10	Muy baja	Alta
Manitol	0,50	Frío	< 160	2-10	Baja	Baja
Eritritol	0,65	Frío	< 160	2-10	Muy baja	Baja
Maltitol	0,75	Ninguno	< 160	2-10	Alta	Media
Isomalta	0,60	Ninguno	< 160	2-10	Alta	Baja
Lactitol	0,40	Ligeramente fresco	< 160	2-10	Muy baja	Media
Malditex	0,75	Ninguno	< 160	2-10	Alta	Media
Fructooligosacáridos	0,30	= Sacarosa	< 140	> 3	= sacarosa	Media

*Bornet, 1994*

La viscosidad de una solución de FOS es relativamente mayor que una de sacarosa a la misma concentración debido al mayor peso molecular de estos compuestos lo que hace que aumente su viscosidad mejorando el cuerpo y la textura.

La estabilidad térmica también es mayor que la de la sacarosa. Los FOS son altamente estables en rangos de pH normales de comida (4,0-7,0), y a temperaturas refrigeradas alrededor de un año. Estas propiedades hacen que los oligosacáridos pueden usarse para alterar la temperatura de congelación de los alimentos congelados, y controlar la intensidad de caramelización en las comidas preparadas debido a las reacciones de Maillard (MussattoI & Mancilha, 2007).

Los FOS pueden sustituir a la sacarosa en muchas de sus propiedades como la solubilidad, punto de congelación y fusión, propiedades cristalinas, etc. (Yun, 1996). Se ha estimado que el valor calórico de los FOS es de 1,5-2,0 kcal/g que es aproximadamente el 40-50% del valor calórico de los carbohidratos digeribles como la sacarosa (Mussatto & Mancilha, 2007).

### **3.1.4 Aplicaciones generales de los FOS**

Los FOS tienen numerosas propiedades interesantes:

- Baja intensidad edulcorante: esta propiedad es usada en gran variedad de alimentos donde el uso de la sacarosa está restringido por su alto dulzor (Yun, 1996).
- No aportan calorías, es decir, el cuerpo humano carece de las enzimas necesarias para hidrolizar las uniones beta, por lo que no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas. Así pues, estas sustancias no se pueden utilizar como fuente de energía para el cuerpo, por lo que son saludables para diabéticos y personas en regímenes de adelgazamiento (Yun, 1996; Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001).
- No son cariogénicos, ya que no son usados por *Streptococcus mutans* para formar ácidos y  $\beta$ -glucanos insolubles, que son los principales causantes de la caries dental (Yun, 1996; Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001).
- Se considera que tienen un comportamiento como fibra alimentaria soluble desde un punto de vista fisiológico. Son carbohidratos no digestibles de origen vegetal

que llegan al intestino grueso donde pueden ser fermentados por la flora colónica y promover el crecimiento de bifidobacterias e impedir el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos (Trowell, 1976; Crittenden & Playne, 1996; Bornet *et al.*, 2002). La degradación bacteriana de los FOS ocurre en dos etapas: en la primera etapa, los monómeros son hidrolizados por beta-hidrolasas bacterianas. En la segunda, los monómeros liberados son fermentados anaeróbicamente produciendo ácidos grasos volátiles de cadena corta (tales como acetato, propionato y butirato, y gases (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>) (Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001).

Estas propiedades, junto con otros efectos fisiológicos beneficiosos de los FOS (baja carcinogenicidad, efecto prebiótico, mejora de la absorción mineral, disminución del nivel de colesterol sérico, fosfolípidos y triglicéridos) (Delzenne, 2003) defienden la adición de los FOS a alimentos que normalmente apenas contienen pequeñas cantidades de estos nutrientes (Yun, 1996).

### 3.2 Contenido de FOS en los alimentos

Varios tipos de NDOs pueden encontrarse como componentes naturales en la leche, miel, frutas y vegetales tales como la cebolla, alcachofa, achicoria, ajos, plátanos, etc. En la mayoría de estos alimentos las concentraciones oscilan entre 0,3 % y 6 % de peso fresco. Específicamente, los espárragos, la caña de azúcar, ajos, achicoria (raíz), dalia (raíz), cebollas, alcachofas, miel, trigo, tomate son fuentes especiales de fructooligosacáridos (**Tabla 6**) (Yun, 1996; Mussatto & Mancilha, 2007). El consumo medio diario se ha estimado entre 1 y 4 g en EEUU y entre 3 y 11 g en Europa.

La inulina y la oligofructosa están oficialmente reconocidos como ingredientes naturales (no como aditivos) de los alimentos y son clasificados como fibra de la dieta en la mayoría de los países europeos (Roberfroid, 2000). Pueden ser usados sin limitaciones específicas como ingredientes en comidas y bebidas (**Tabla 7**).

<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de inulina por peso fresco de algunos alimentos		
<b>ALIMENTO</b>	<b>INULINA (%)</b>	<b>FOS (%)</b>
Ajo	15-20	3-6
Alcachofa	3-10	<1
Alcachofa de Jerusalem	15-20	10-15
Achicoria (raíz)	15-20	5-10
Cebolla	2-6	2-6
Diente de león	12-15	n.d.
Espárragos (raíz)	10-15	
Trigo	1-4	1-4

*Modificado de Kaur & Gupta, 2002.*

Dado su alto contenido en inulina ( $> 15\%$ ), las alcachofas de Jerusalén y la achicoria se utilizan para la producción industrial de inulina. Estos fructanos son compuestos bajos en energía, su contenido energético equivale solamente del 40-50% de los carbohidratos digeribles, dándoles un valor calórico de 1,0–2,0 Kcal/g. La inulina y la oligofructosa se usan en la dieta de personas obesas (Kaur & Gupta, 2002).

Actualmente, la inulina y los FOS están siendo incluidos en numerosos productos alimentarios humanos y animales por su efecto positivo como probiótico estimulante del crecimiento de la flora intestinal no patógena. Han encontrado aplicación en nutraceúticos y dietética, productos lácteos, alimentos para pequeños animales (Petfoods) y en menor medida en animales de producción (Chemedia, 2008) (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Descripción de alimentos con las aplicaciones de inulina y oligofruktosa

<b>Aplicación</b>	<b>Funcionalidad</b>	<b>Dosis de inulina (% w/w)</b>	<b>Dosis de oligofruktosa (% w/w)</b>
Leche y productos lácteos	Sustituto de azúcar y grasas Sinergia con edulcorantes Cuerpo y sabor Fibra y prebiótico	2-10	2-10
Postres congelados	Sustituto de azúcar y grasas Textura Sinergia con edulcorantes Fibra y prebiótico	2-10	5-12
Margarinas (table spreads)	Sustituto de grasas Textura Estabilidad de emulsión Fibra y prebiótico	2-10	-
Pan y bollería	Fibra y prebiótico Retención de humedad Sustituto del azúcar	2-15	2-25
Cereales	Fibra y prebiótico	2-25	2-15
Rellenos	Sustituto de azúcar y grasas Mejora la textura	2-30	2-50
Preparados de fruta	Sustituto de azúcar Sinergia con edulcorantes Cuerpo y sabor Fibra y prebiótico	2-10	2-50
Ensaladas	Sustituto de grasas Cuerpo y sabor	2-10	-
Productos cárnicos	Sustituto de grasas Textura y estabilidad Fibra	2-10	-
Productos dietéticos	Sustituto de azúcar y grasas Sinergia con edulcorantes Bajo valor calórico Cuerpo y sabor Fibra y prebiótico	2-15	2-20
Chocolate	Sustituto de azúcar Fibra Resistencia al calor	5-30	-
Comprimidos	Sustituto de azúcar Fibra y prebiótico	5-100	2-10

*Franck, 2002*

### 3.3 Efectos beneficiosos de los FOS sobre el organismo

#### 3.3.1 Efecto prebiótico

Es generalmente aceptado que la comunidad bacteriana residente en el tracto gastrointestinal humano tiene un impacto fundamental en la función intestinal y en la salud humana (Blaut, 2002; Conway, 2001). Esta comunidad está constituida por al menos  $10^{14}$  células bacterianas que representan a más de 400 especies diferentes (Bourlioux *et al.*, 2003). Aunque las bacterias se distribuyen a través del tracto gastrointestinal, su diversidad e importancia numérica varían en los diferentes tramos (Bourlioux *et al.*, 2003; Salminen *et al.*, 1998). Mientras que el contenido del estómago y el intestino delgado sólo contienen entre  $<10^3$  y  $10^4$ – $10^6$  células/ml respectivamente (Salminen *et al.*, 1998), el intestino grueso (en particular el colon) es un ecosistema intensamente poblado con una densidad celular de  $10^{12}$  células bacterianas/g de masa seca (Blaut, 2002; Gibson, 1999). La mayoría de estas bacterias del colon son anaerobias estrictas (Conway, 2001; Blaut, 2002).

Generalmente las bacterias de la flora intestinal se pueden dividir en géneros que son perjudiciales o beneficiosos para el hospedador. Entre las bacterias perjudiciales se incluyen especies de los géneros *Clostridium*, *Veillonella*, *Staphylococcus*, *Proteus*, y algunas veces *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Escherichia*, y *Streptococcus*. Estas bacterias producen sustancias potencialmente dañinas para el hospedador, tales como productos de putrefacción, toxinas y carcinógenos (Gibson & Roberfroid, 1995) y pueden causar efectos patógenos, tales como diarrea, infecciones, daños en el hígado, carcinogénesis y putrefacción intestinal (Gibson, 1998). Las bacterias beneficiosas, que incluyen especies de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, y ocasionalmente *Streptococcus*, *Enterococcus*, y *Bacteroides*, son útiles en aspectos relacionados con la nutrición y la prevención de enfermedades (Gibson & Roberfroid, 1995; Bourlioux *et al.*, 2003). Un aumento del número y la actividad de estas bacterias es por tanto deseable (Gibson, 1998) (**Tabla 8**).

<b>Tabla 8.</b> Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos sobre la microbiota intestinal humana					
Sujetos	Dosis (g)	Periodo de alimentación (días)	<u>Bifidobacterias fecales</u>		
			Antes	Después	P
<b>Pacientes con fallo renal</b>					
n=9	6	90	8,7±1,3	9,8±0,4	<0,05
n=10	6	30	8,7	9,8	-
<b>Pacientes seniles</b>					
n=23	8	14	8,8±1,1	9,7±0,5	<0,01
n=23	8	14	8,8±1,0	9,7±0,5	<0,005
<i>Bornet, 1994</i>					

Los FOS de la dieta escapan de la hidrólisis enzimática del intestino delgado y entran al ciego sin cambios en su estructura. Estas sustancias no son excretadas en las heces, lo que indica que son fermentadas completamente en el colon (Conway, 2001; Blaut, 2002). La utilización de estos componentes es mediada por las enzimas de hidrólisis de las bacterias del colon, de tal forma que las bacterias producen enzimas glicolíticas que los hidrolizan en mono o disacáridos los cuales son transportados al interior de la célula donde son metabolizados a ácidos grasos de cadena corta, L-lactato, dióxido de carbono e hidrógeno (Grizar & Barthomeuf, 1999; Gibson & Roberfroid, 1995; Salminen *et al.*, 1998). Estos ácidos grasos de cadena corta, particularmente acetato, propionato, y butirato, son los principales productos finales de las reacciones de fermentación bacteriana que acidifican el colon (Miller & Wolin, 1996; Swennen *et al.*, 2006). Esta disminución del pH del medio es favorable para el desarrollo de bacterias como bifidobacterias y lactobacilos, y genera un medio adverso para el crecimiento de especies potencialmente patógenas (Blaut, 2002; Swennen *et al.*, 2006).

La resistencia a la acidez gástrica, a la hidrólisis por las enzimas intestinales humanas y a la absorción intestinal, así como el ser fermentados por la microflora

intestinal y el hecho de que estimulen de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad de las bacterias que contribuyen al bienestar y la salud del hospedador, confieren a los FOS su propiedad de prebióticos. Definimos prebiótico como “un ingrediente fermentado de forma selectiva que da lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, confiriendo beneficios en el bienestar y la salud del hospedador” (Gibson *et al.*, 2004).

### **3.3.2 Efectos relacionados con la producción de ácidos grasos de cadena corta**

Como hemos comentado anteriormente, la fermentación colónica de los FOS por las bacterias produce ácidos grasos de cadena corta, lactato y gases como productos de su digestión. Todos los ácidos grasos de cadena corta se absorben rápidamente en el intestino grueso para ser metabolizados por los distintos tejidos: el butirato por el epitelio colónico, el propionato y el acetato (en parte) por el hígado, y el acetato (en parte) por el músculo y otros tejidos periféricos (Salminen *et al.*, 1998; Blaut, 2002).

Según algunos autores, la absorción de ácidos grasos de cadena corta influye en el metabolismo del hospedador (Miller & Wolin, 1996; Swennen *et al.*, 2006). El acetato y el propionato influyen en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Brandt, 2001; Salminen *et al.*, 1998; Roberfroid & Delzenne, 1998). El propionato reduce la gluconeogénesis hepática e inhibe la formación de urea en el hígado (Roberfroid & Delzenne, 1998; Delzenne *et al.*, 1995). El acetato es un ácido que disminuye el pH eficazmente eliminando bacterias patógenas antes de que estas produzcan metabolitos que pueden ser pre-carcinogénicos (Brandt, 2001). El butirato es una importante fuente de energía, así como un regulador del crecimiento y la diferenciación de las células de la mucosa intestinal (Brandt, 2001).

### **3.3.3 Alivio del estreñimiento**

El estreñimiento es común y afecta a una gran parte de la población, particularmente a las personas mayores. Otros grupos de riesgo son embarazadas, mujeres en periodo de lactancia, niños destetados, personas que intentan perder peso e

individuos con formas de vida interrumpidas (empleados a turno o los hombres de negocios que viajan a largas distancias) (Brandt, 2001). Los principales síntomas son dificultad al defecar y un vaciamiento del recto incompleto. Como primera medida el tratamiento suele ser dietético (Salminen *et al.*, 1998).

Los efectos positivos de la ingesta diaria de FOS pueden contribuir a un aumento de la masa microbiana y de la producción de gas, dando lugar a un incremento del contenido cecal en el colon (Jenkins *et al.*, 1999). Los productos finales de la fermentación de los FOS por las bacterias del colon, los ácidos grasos de cadena corta, son absorbidos y utilizados por las células del epitelio colónico humano, estimulando su crecimiento así como la absorción de sales y agua, lo que da lugar a un incremento de la humedad del bolo cecal a través de la presión osmótica, con la consecuencia del aumento de la motilidad intestinal (Mussatto & Mancilha, 2007). El incremento del bolo cecal estimula el paso a través del colon, dando como resultado un tiempo de tránsito más corto y una reducción del tiempo disponible para la reabsorción del agua. Todos estos factores dan lugar a un incremento del peso de las heces con una composición más suave (Brandt, 2001).

A pesar de lo dicho anteriormente, los oligosacáridos no digeribles pueden también causar efectos indeseables. Ya que los FOS tienen propiedades osmóticas y son completamente fermentados en el intestino grueso, pueden causar en algunos sujetos malestar intestinal e incluso funcionar como laxantes (a altas dosis diarias). Los FOS son una fuente importante de gas intestinal y para algunas personas la generación rápida de gas puede ser una molestia importante llegando a producir dolor abdominal, eructación, flatulencia, hinchazón de estómago, y calambres intestinales. Además, una alta ingesta de FOS puede causar procesos diarreicos. Esto es debido a la retención osmótica de líquidos en el intestino delgado y grueso. Sin embargo, la aparición y la intensidad de estos efectos depende de la dosis, de la ingesta diaria del producto, y pueden variar significativamente de un individuo a otro (Swennen *et al.*, 2006). Hond *et al.* (2000) observaron que el tiempo de tránsito intestinal no se veía afectado con dosis diarias de entre 4-15 g/día pero que tales dosis incrementaban la frecuencia de deposiciones y el volumen fecal en individuos sanos. En personas mayores que sufrían estreñimiento se ha visto que la ingesta de inulina a dosis de entre 20-40 g/día

incrementa la frecuencia de deposiciones con gran variabilidad entre los sujetos y acompañado en alguno de los casos de flatulencias (Kleessen *et al.*, 1997).

### **3.3.4 Efectos sobre la absorción de minerales**

En varias investigaciones, usando animales como modelo experimental, se ha demostrado el efecto positivo de la ingesta de FOS sobre la absorción de minerales como el calcio, magnesio, hierro y zinc (Scholz-Ahrens *et al.*, 2001; Ohta *et al.*, 1995). Se ha observado que el consumo de prebióticos estimula la absorción y retención de varios minerales, particularmente magnesio, calcio y hierro (Ohta *et al.*, 1995; Scholz-Ahrens *et al.*, 2001). En general, la fibra dietética se une o secuestra minerales, lo que reduce su absorción en el intestino delgado y su llegada al colon (Mussatto & Mancilha, 2007; Roberfroid & Delzenne, 1998). Sin embargo, durante la fermentación en el colon de la fibra soluble, los minerales unidos o secuestrados se liberan estando disponibles para ser absorbidos. Por otra parte, la alta concentración de ácidos grasos de cadena corta, debido a la fermentación colónica de los FOS, disminuye el pH del colon e incrementa así la solubilidad/biodisponibilidad de los minerales, particularmente del calcio y del magnesio (Roberfroid & Delzenne, 1998). Además, es también probable que los FOS incrementen el contenido de agua en el colon, aumentando a su vez la solubilidad de algunos minerales. Se ha sugerido que los ácidos grasos de cadena corta, especialmente el butirato, estimula la proliferación de las células epiteliales del colon, de tal modo que se aumenta la capacidad de absorción del epitelio (Scholz-Ahrens *et al.*, 2001).

El consumo regular de FOS puede ser particularmente relevante para las mujeres postmenopáusicas y los ancianos, previniendo o posponiendo la osteoporosis y la anemia. El incremento de la absorción de calcio, reduce el riesgo de osteoporosis ya que este mineral promueve el incremento de la densidad y la masa ósea (Mussatto & Mancilha, 2007). Una mejor absorción de calcio en adolescentes y/o mujeres posmenopáusicas se ha demostrado con la ingesta de oligosacáridos no digeribles (Scholz-Ahrens *et al.*, 2001; Swennen *et al.*, 2006).

La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en el colon podrían tener importantes aplicaciones: pueden ayudar a mantener la salud del colon controlando la tasa de *turnover* celular; además, altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el contenido colónico pueden ayudar a formar sales biliares o de ácidos grasos insolubles reduciendo así la peligrosa actividad de la bilis y los ácidos grasos sobre las células del colon (Wargowich *et al.*, 1984).

### **3.3.5 Regulación del metabolismo lipídico**

Se ha visto que los FOS disminuyen el nivel de lípidos sanguíneos y tienen un efecto hipotrigliceridémico y de disminución del nivel del colesterol en sangre, reduciendo así el riesgo de diabetes y obesidad (Mussatto & Mancilha, 2007). Se han propuesto 3 mecanismos que podrían explicar estos efectos:

El primero es la modificación de las concentraciones de glucosa o insulina. Los FOS reducen los picos de glucosa en sangre que ocurren después de las comidas y como consecuencia no se activan las enzimas lipogénicas.

El segundo es la producción de ácidos grasos de cadena corta en el colon. El propionato inhibe las rutas de colesterogénesis y lipogénesis mientras que el acetato las estimula. Parece así, que el patrón de fermentación de los FOS y sobre todo el cociente entre acetato y propionato que llega al hígado, es un supuesto marcador intermedio que predice las potenciales características de los FOS de disminuir los lípidos.

El tercer mecanismo propone que el colesterol en suero está reducido debido a la precipitación y excreción de ácidos biliares al intestino, lo que requiere al hígado para utilizar colesterol para posteriormente sintetizar ácidos biliares.

Por otra parte, cambios en la concentración del colesterol sérico han sido relacionados con cambios en la microflora intestinal. Algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* asimilan el colesterol presente en el medio, mientras que otras inhiben la absorción de colesterol a través de la pared intestinal (Mussatto & Mancilha, 2007).

Existe una alta correlación positiva entre el nivel de lípidos del suero y la incidencia de enfermedades cardiovasculares, lo que hace de los FOS una posible

herramienta para prevenir las enfermedades cardiovasculares (Delzenne, 2003). En ratas alimentadas con una dieta rica en lípidos y suplementada con 100g de fructooligosacáridos/kg de dieta, se observó una disminución en la trigliceridemia de los animales sin ningún efecto protector sobre la acumulación de triglicéridos hepáticos y la lipogénesis, sugiriendo un posible modo de acción periférico (Kok *et al.*, 1998). En cambio, ratas Zucker obesas suplementadas en la dieta con fructanos se observó una reducción de la esteatosis hepática, sin ningún efecto sobre la trigliceridemia postprandial (Daubioul *et al.*, 2000). Este efecto probablemente sea el resultado de la reducida disponibilidad de los ácidos grasos no esterificados del tejido adiposo, ya que la masa grasa y el peso corporal disminuyeron con el tratamiento. La protección contra la esteatosis depende fuertemente del patrón de fermentación (Daubioul *et al.*, 2002); la alta proporción de propionato producida en el ciego (que alcanza el hígado a través de la vena porta) es, al menos en animales, un factor clave en la reducción de la síntesis de triacilglicerol hepático observada cuando los oligosacáridos son dados a ratas Zucker normales y obesas (Delzenne, 2003).

El acetato puede ser considerado un sustrato lipogénico y colesterogénico, mientras que el propionato actúa como un inhibidor de la síntesis de lípidos hepáticos (Demigné *et al.*, 1999). El efecto de la suplementación de la dieta con FOS (dosis de 8-20 g/d) sobre los lípidos sanguíneos ha sido investigada en numerosos estudios humanos. Tres de once estudios observaron una reducción significativa de triglicéridos en suero, mientras que 5 estudios observaron una modesta reducción del colesterol total y del LDL-colesterol (Delzenne, 2003).

### **3.3.6 Influencia sobre la glicemia/insulinemia**

Los efectos de los FOS sobre la glicemia e insulinemia son todavía contradictorios. Algunos datos indican que estos efectos dependen en gran medida de las condiciones fisiológicas o del grado de evolución de la enfermedad (diabetes). Se ha observado que en ratas, una dieta suplementada con oligofruktosa a una dosis del 10% durante 30 días reduce la glicemia y la insulinemia postprandial un 17% y 26% respectivamente. Sin embargo la respuesta glicémica mediante un test de tolerancia a la

glucosa en los animales después de una noche en ayunas fue idéntica en ratas control y ratas suplementadas con oligofructosa (Roberfroid & Delzenne, 1998).

La hiperglicemia y la hiperinsulinemia pueden indicar diabetes mellitus, un desorden metabólico en el cual el cuerpo es incapaz reproducir o responder correctamente a la insulina. Hay dos formas de diabetes, tipo I y II, la de tipo II es la forma más común. Casi el 10% de los ancianos hacen frente a la diabetes tipo II, también conocida como la forma no dependiente de insulina de la diabetes mellitus. Este tipo de diabetes está a menudo ligada a la obesidad y los pacientes pueden retrasar o controlar la enfermedad con la dieta. Uno de los objetivos de la modificación de la dieta es la de tratar de prevenir los picos de glucosa en sangre después de la comida (Swennen *et al.*, 2006), ya en 1955, se publicó que la inulina prevenía tales picos y modificaba la absorción de macronutrientes por retraso del vaciamiento gástrico y/o disminución del tiempo de tránsito intestinal (Kaur & Gupta, 2002; Tunland, 2008).

Los FOS influyen además en la glicemia e insulinemia plasmática por su efecto en la producción de ácidos grasos de cadena corta bacterianos. Particularmente, el propionato reduce la gluconeogénesis y favorece la glicólisis hepáticas. Este ácido graso también influye indirectamente en el metabolismo hepático de la glucosa, bajando la concentración de ácidos grasos en plasma, un factor que está relacionado con la gluconeogénesis (Kaur & Gupta, 2002).

El hecho de que los oligosacáridos no digeribles puedan influir en la producción de hormonas intestinales es interesante, y podría sugerir que estas hormonas pueden ser una unión entre la fermentación en la parte baja del intestino y las consecuencias sistémicas del alimento colónico, tales como la ingesta de oligosacáridos (Delzenne, 2003).

### ***3.3.7 Disminución del riesgo de cáncer de colon***

La dieta es un factor importante que influye en la prevalencia del cáncer de colon. Las dietas que contienen altas concentraciones de proteínas animales y grasas y bajas concentraciones de fibra dietética se han asociado con un mayor riesgo de padecer

cáncer de colon. Recientes investigaciones sugieren que los FOS puede inhibir el proceso de desarrollar cáncer de colon, principalmente por el aumento de bacterias beneficiosas y los ácidos grasos de cadena corta producidos durante la fermentación de los FOS en el colon. Las bacterias que promueven la salud inhiben el crecimiento de bacterias patógenas y disminuye así la producción de sustancias carcinógenas y enzimas bacterianas que desempeñan un papel en la carcinogénesis del colon. Al mismo tiempo, el crecimiento bacteriano incrementa la biomasa y el bolo cecal acelerando el tiempo de tránsito colónico. Consecuentemente, el tiempo de exposición de la microbiota colónica a los potenciales agentes carcinógenos disminuye. Hay también evidencia de que las sales biliares están implicadas en la carcinogénesis colónica y que los FOS pueden disminuir su concentración fecal, probablemente a través de la reducción del pH colónico. La presencia del butirato promueve la proliferación de células normales y suprime la de las células cancerígenas. Además, incrementa la muerte celular programada en las células transformadas pero no en células normales (Swennen *et al.*, 2006).

Por otro lado, las criptas aberrantes son potenciales lesiones precursoras de adenomas y carcinomas que se puedan desarrollar en el colon. La administración de oligofructosa en la dieta ha suprimido de forma significativa el número total de focos de criptas aberrantes comparado con una dieta control, sugiriendo así que los FOS pueden suprimir la formación de tumores en el colon (Wargovich *et al.*, 1996; Reddy, 1999). En animales se ha observado que la administración de *Bifidobacterium longum* liofilizado inhibe la formación de criptas aberrantes y la formación de tumores de colon y mama (Kulkarni & Reddy, 1994; Reddy, 1999). La inhibición del cáncer de colon se ha asociado con una disminución de la proliferación de las células de la mucosa colónica y de la actividad de la enzima ornitina descarboxilasa (Reddy, 1999), una enzima clave en el proceso de síntesis de poliaminas.

### **3.3.8 Modulación del sistema inmune**

Recientemente, la ingesta de FOS se ha asociado a efectos beneficiosos sobre la inmunomodulación del sistema inmune intestinal. Estos incluyen la inmunoregulación

de la secreción intestinal de IgA e interferon (IFN)- $\gamma$  por las placas de Peyer, el incremento de la expresión del receptor de inmunoglobulinas poliméricas en el intestino delgado de crías de ratones, y el desarrollo del tejido linfoide asociado al intestino (Roberfroid & Delzenne, 1998; Boehm *et al.*, 2004).

Se ha propuesto que los cambios en la microbiota intestinal y la producción de ácidos grasos de cadena corta producidos por las bacterias intestinales después de la administración de FOS podrían estar implicados (Fukasawa *et al.*, 2007). En tales efectos se han propuesto varias hipótesis: la primera sugiere que el incremento de las bacterias del ácido láctico debido a la fermentación de los FOS, o la pared celular, o contenidos citoplásmicos de estas bacterias, pueden penetrar en las células del epitelio intestinal dando lugar a la activación del tejido linfoide asociado al intestino. La segunda hipótesis sugiere que los ácidos grasos de cadena corta producidos por la fermentación, influyen en el sistema inmune por sus propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Una tercera hipótesis mantiene que el butirato reduce los requerimientos de glutamina de las células epiteliales, que quedaría a disposición de las células del sistema inmune (Swennen *et al.*, 2006).

### **3.4 Fructooligosacáridos en la leche materna y su papel en el neonato**

Los oligosacáridos libres son constituyentes naturales de la leche de todos los mamíferos. Cuantitativamente los oligosacáridos son el tercer componente mayoritario de la leche materna después de la lactosa y los lípidos (Gudiel-Urbano & Goñi, 2001). La Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (ESPGAN) indica que la leche materna contiene aproximadamente 7 g de carbohidratos por cada 100 ml, un 90% de ellos son lactosa y el resto oligosacáridos (7-12 g/L) (ESPGAN, 1977; Boehm & Stahl, 2007). Comparado con la leche humana, la concentración de oligosacáridos en la leche de los animales domésticos más relevantes es menor en un factor de 10 a 100 (Boehm & Stahl, 2007). Las funciones biológicas de los oligosacáridos están muy relacionadas con su conformación (Kunz *et al.*, 2000). Los principales componentes de los oligosacáridos encontrados en leche humana son: ácido siálico, N-acetilglucosamina, L-fucosa, D-glucosa y D-galactosa. Estos componentes se combinan

de forma diferente para formar 130 oligosacáridos distintos tales como oligosacáridos fucosilados, neutros, sialil lactosa, Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc, etc. (Sabharwal *et al.*, 1991; Baró *et al.*, 2001).

Durante la lactancia la composición de los oligosacáridos de la leche materna varía, encontrando las mayores concentraciones en las primeras etapas (Kunz *et al.*, 2000). Las mayores concentraciones de oligosacáridos se encuentran en el calostro (24% del total de carbohidratos), disminuyendo a 19% en el primer mes y al 15% en el segundo mes (Miller *et al.*, 1994; Engfer *et al.*, 2000). Además de los cambios temporales, existe una gran variabilidad en la composición de los diferentes oligosacáridos en mujeres que están en la misma etapa de lactación (Miller *et al.*, 1994). El contenido de oligosacáridos de la leche materna varía con la edad gestacional del bebé, la duración de la lactancia, el momento del día y la herencia genética de la madre (McVeagh & Miller, 1997). Es posible que los cambios en la composición de los oligosacáridos se deban también a una adaptación programada de la composición de la leche para cubrir las necesidades de los niños, asociado con un aumento en la maduración del sistema inmune o con el envejecimiento de las células responsables de la producción de leche (Miller *et al.*, 1994).

### **3.4.1 Beneficios del aporte de oligosacáridos en la leche materna**

Los oligosacáridos de la leche materna tienen numerosas funciones que ayudan a proteger la salud de los niños alimentados a pecho (McVeagh & Miller, 1997). Durante muchos años se pensaba que los oligosacáridos de la leche humana jugaban un papel solamente en el desarrollo de una flora intestinal específica en los niños alimentados a pecho, pero hoy en día se sabe que son un potente inhibidor de la adhesión bacteriana a la superficie epitelial (etapa inicial del proceso infectivo) (Miller *et al.*, 1994).

Los oligosacáridos forman la fibra soluble de la leche materna y no son hidrolizados en el intestino delgado (Engfer *et al.*, 2000), sino que alcanzan el intestino grueso con su estructura intacta actuando como ligandos competitivos que protegen al niño de los patógenos (McVeagh & Miller, 1997). Ellos son el sustrato para las bacterias del colon y así contribuyen a las diferencias que hay en el pH y la flora fecal

entre los niños alimentados con leche materna y los niños alimentados con fórmulas infantiles (McVeagh & Miller, 1997).

La característica antiinfectiva de los oligosacáridos se debe a su capacidad de inhibir la adhesión de bacterias a la superficie epitelial en los tractos gastrointestinal, respiratorio y urogenital. Los oligosacáridos libres y las glicoproteínas de la leche materna, que están presentes en gran cantidad y variedad, podrían prevenir el ataque de microorganismos actuando como receptores análogos que compiten con los ligandos del epitelio para unirse a las bacterias (Newburg, 1997; Kunz *et al.*, 2000). De este modo los oligosacáridos pueden actuar en niños cuyo pH estomacal no es tan ácido como el de adultos, y cuyo sistema inmunológico no es completamente maduro, como protección adicional contra patógenos entéricos por inhibición de la adhesión de estos agentes a la mucosa de la superficie intestinal (Engfer *et al.*, 2000; Newburg, 1997).

Otro mecanismo de acción de los oligosacáridos es debido a la disminución del pH intestinal que provocan. Los oligosacáridos son un factor de crecimiento para *Bifidobacterium bifidum* var. *pennylvanicus*. En presencia de lactosa, este microorganismo libera ácidos grasos de cadena corta y crea un medio ácido inhibiendo el crecimiento de agentes patógenos (Kunz *et al.*, 2000; Rivero-Urgell & Santamaría-Orleans, 2001).

Por otra parte, los oligosacáridos podrían jugar un importante papel en el desarrollo del cerebro posnatal (Carlson, 1985). Los oligosacáridos son hidrolizados a monosacáridos (D-glucosa, D-galactosa, N-acetilglucosamina, L-fucosa y ácido siálico), y el ácido siálico es un componente básico de los gangliósidos del cerebro y las glicoproteínas. Además, el alto contenido en ácido siálico de la leche humana durante la primera semana de lactación coincide con un periodo de síntesis rápida de sialoglicoproteínas y gangliósidos (Miller *et al.*, 1994; Rivero-Urgell & Santamaría-Orleans, 2001). Los galactocerebrósidos, son el glicolípido predominante de la mielina. El hígado no es capaz de proveer toda la galactosa necesaria durante el periodo de mielinización y desarrollo del cerebro. Es posible que un papel de los oligosacáridos de la leche materna, en los que la galactosa es un componente principal, sea además

asegurar que los niveles de galactosa para el niño no sean un factor limitante en este periodo (Kunz *et al.*, 2000).

Los oligosacáridos están asociados a un bajo riesgo de infecciones y diarrea, y a un mejor desarrollo de la respuesta del sistema inmune. Debido a la disminución del pH intestinal causada por su fermentación, los oligosacáridos provocan una disminución de los microorganismos potencialmente patógenos, un aumento de bifidobacterias y un aumento de la disponibilidad de minerales (Rivero-Urgell & Santamaría-Orleans, 2001).

### **3.4.2 Posibles efectos de la adición de FOS a las fórmulas infantiles**

En la industria alimentaria, la composición y estructura de los oligosacáridos de la leche humana no pueden ser reproducidas con exactitud ya que se usa como base la leche de vaca. Así, otros grupos de oligosacáridos de origen vegetal como los FOS son usados en alimentos infantiles, intentando obtener los efectos potencialmente beneficiosos de los oligosacáridos de la leche humana (Rivero-Urgell & Santamaría-Orleans, 2001).

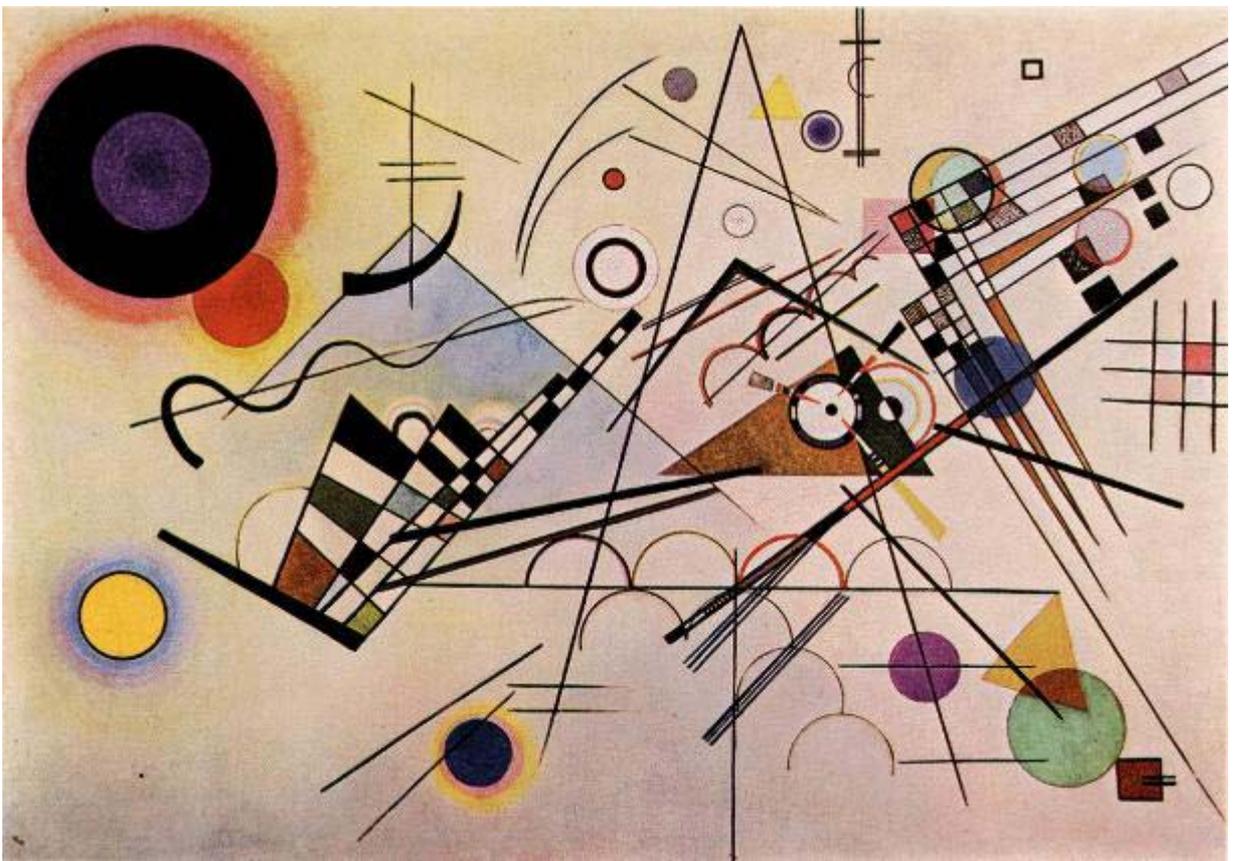
Existen pocos estudios acerca de cómo las diferencias químicas entre los oligosacáridos de la leche humana y FOS, afectan a las funciones y efectos fisiológicos de los recién nacidos. En varios ensayos clínicos se ha demostrado que la mezcla de galactooligosacáridos (GOS) y FOS estimula la flora intestinal de los niños alimentados con fórmulas infantiles de la misma manera que ocurre en los niños alimentados con leche materna (Boehm & Stahl, 2007). Ésto se observó con respecto al recuento de bifidobacterias fecales (Moro *et al.*, 2002), reducción de patógenos, composición de ácidos grasos de cadena corta fecales, pH fecal, así como en la frecuencia y consistencia de las heces (Moro *et al.*, 2002; Knol *et al.*, 2005). En varios experimentos con animales se ha observado que la adición de FOS a las fórmulas infantiles produce un incremento de la proliferación celular de la mucosa colónica, sugiriendo que la consumición de FOS promueve las poblaciones de bifidobacterias y previene la atrofia de la mucosa del epitelio colónico en neonatos alimentados con una dieta elemental (Howard *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 1995).

La leche materna contiene gran variedad de componentes antiinflamatorios e inmunológicos. La flora intestinal de los niños alimentados a pecho es un importante factor trófico en la función del intestino y el desarrollo del sistema inmune. Moro *et al.* (2006) observaron que la ingesta de una mezcla de FOS/GOS en niños de 6 meses de edad reducía significativamente la dermatitis atópica, lo que se asocia a un retraso de la maduración de las respuestas inmunitarias al principio de la lactancia y a concentraciones elevadas de IgE frente a los antígenos de la dieta presentes en el suero. La ingesta de FOS también se ha asociado a una disminución de la incidencia de infecciones del tracto respiratorio y diarrea en niños alimentados con fórmulas infantiles. Estos estudios indican que los FOS pueden modular el sistema inmune intestinal y pueden contribuir al establecimiento de una defensa efectiva contra las infecciones, jugando un papel importante en la prevención primaria de las alergias en niños destetados precozmente (Boehm *et al.*, 2004).

En los últimos años ha sido aceptado que la microflora intestinal puede jugar un importante papel en el desarrollo del sistema inmune de los niños. Se ha confirmado que los FOS son beneficiosos para la salud del colon, ya que estimulan de forma selectiva el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos (efecto prebiótico) e impiden el ataque de microorganismos potencialmente patógenos a las células intestinales. En el futuro, la manipulación selectiva de la microbiota intestinal podría ser un nuevo avance en las estrategias para prevenir las alergias e infecciones en los niños.



### *III. Material y métodos*



*Composición VIII, Kandinsky*



## 1. ANIMALES Y DIETAS

Los animales fueron estabulados siguiendo la legislación vigente en materia de bienestar y experimentación animal y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia.

Cuarenta lechones recién nacidos (Landrace x Large White) fueron obtenidos de la granja veterinaria de la Universidad de Murcia, España. 10 lechones permanecieron con sus madres hasta los 15 días de vida y fueron amamantados por las mismas (**Figura 12**). El resto de lechones (n=30) permanecieron con sus madres hasta los 2 días de vida y posteriormente se estabularon al azar en 3 grupos de 10 en incubadoras con temperatura, luz y humedad controladas (**Figura 13**).

**Figura 12.** Lechones en las parideras alimentados con leche materna





La leche de cerda es extraordinariamente rica en grasa, muy digestible por su contenido en ácidos grasos de cadena corta, lactosa y proteína con un óptimo perfil aminoacídico. Esto es fundamental para la supervivencia del lechón, y sin embargo en el mercado no se encuentra ninguna leche maternizada que imite en su composición en macronutrientes a la leche de cerda (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Composición de macronutrientes de distintas dietas para lechones (g/L)

	LECHE CERDA	COMERCIAL (Milkivit)	FORMULADA
PROTEÍNAS	55	32,955	47,940
HIDRATOS DE CARBONO	58	69,945	55,084
GRASA	50-60	26,73	68,056

Uno de nuestros objetivos fue ensayar una fórmula específica para lechones con una composición en macronutrientes similar a la leche de cerda y ver los efectos de la adición a la misma de FOS y poliaminas en cerdos de 2 días de vida.

Los tres grupos de animales fueron alimentados con una de las siguientes fórmulas:

- Fórmula control: Fórmula láctea diseñada para lechones (**Tabla 9**).
- Fórmula suplementada con poliaminas: Fórmula láctea específica para lechones suplementada con 5 nmol/ml de espermina y 20 nmol/ml de espermidina, reflejando los niveles de poliaminas detectados en la leche de cerda. Estas dosis de poliaminas fueron calculadas a partir de la concentración media de poliaminas de 10 muestras de leche de cerda analizadas en este trabajo (**Tabla 10**).

<b>Tabla 10.</b> Contenido en poliaminas de la leche de cerda durante las dos primeras semanas de lactancia (nmol/ml)			
<b>Día de lactancia</b>	<b>Putrescina</b>	<b>Espermidina</b>	<b>Espermina</b>
4 (n = 3)	0,94	21,33	11,47
5 (n = 1)	0,00	17,26	2,78
6 (n = 1)	5,87	17,58	10,19
7 (n = 2)	0,31	27,73	2,33
11 (n = 1)	0,41	21,77	2,59
13 (n = 1)	0,70	30,59	3,56
15 (n = 1)	0,72	12,06	1,17
<b>Media ± EEM</b>	<b>1,28 ± 0,77</b>	<b>21,19 ± 2,41</b>	<b>4,87 ± 1,57</b>
<i>n = número de animales analizados</i>			

- Fórmula suplementada con FOS: Fórmula láctea específica para lechones suplementada con 8 g por litro de FOS reflejando los niveles de oligosacáridos de la leche materna (Kunz *et al.*, 2000). El FOS empleado fue Raftilosa P95, suministrado por DANONE S.A.

La fórmula láctea fue diseñada por la empresa “PIENSOS CARNISA” con una composición en macronutrientes similar a la leche de cerda (Hrboticky *et al.*, 1989) y acorde a los requerimientos nutricionales para el crecimiento de los lechones (National Research Council, 1998) (**Tabla 11**).

La dosificación para reconstituir la fórmula fue de 200 gramos de leche en polvo por cada litro de agua.

### ***Protocolo nutricional***

Del 2° al 5° día los lechones fueron alimentados con biberones cada tres horas hasta saciedad, en total 8 tomas por día.

A partir del 6° día las tomas se redujeron a seis, descansando toda la noche.

Se realizó la medida de la ingesta diaria de los animales alimentados con las fórmulas, así como el control de peso de todos los animales cada dos días.

<b>Nutrientes</b>	<b>%</b>
Proteína bruta	27,05
Lisina	2,14
Grasas	33,22
Lactosa	29,96
Vitaminas	5,0
Minerales	4,76
Calcio	0,69
Fósforo	0,49

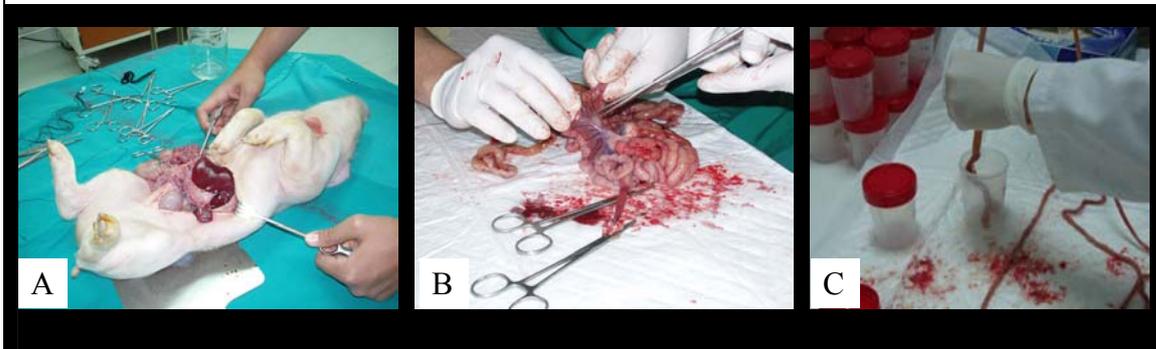
**Tabla 12.** Composición en ácidos grasos de la fórmula láctea diseñada para lechones

Ácidos grasos	%
C4:0	0,0319
C6:0	0,0159
C8:0	1,0781
C10:0	1,0863
C12:0	8,9509
C14:0	3,7651
C16:0	31,0650
C16:1	0,0262
C18:0	4,8008
C18:1	35,1280
C18:2	12,5001
C18:3	0,988
C:20	0,1183

## 2. PROTOCOLO DE DISECCIÓN

A los 15 días de edad los cerdos fueron privados de comida durante toda la noche. A la mañana siguiente los animales fueron anestesiados con una inyección vía retroocular de una mezcla 50:50 de Ketamina:Propofol (1 ml/kg). La pared abdominal fue abierta y se extrajo el tracto gastrointestinal (**Figura 14A y 14B**). Mediante hilo de cirugía se cerraron las distintas porciones de intestino, separándose yeyuno, íleon, ciego y colon y evitando la mezcla de heces entre las distintas zonas. Se realizó la medida de la longitud total del tracto gastrointestinal. El contenido cecal fue eliminado y colocado inmediatamente en un contenedor estéril bajo condiciones anaeróbicas (CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>) (**Figura 14C**).

**Figura 14.** (A) Disección de la pared abdominal del animal; (B) Extracción del tracto gastrointestinal; (C) recogida del contenido intestinal en contenedores estériles



Las muestras de contenido cecal fueron transportadas y procesadas microbiológicamente dentro de las 2-4 horas después de su recogida. La membrana mesentérica se cortó usando unas tijeras y cinco muestras de tejido intestinal de 1 cm de longitud fueron tomadas al 10, 25, 50, 75 y 90 % de la longitud total del intestino delgado (**Figura 15A**). Dos muestras de tejido cecal de 1 cm de longitud fueron tomadas del ciego. Las muestras de tejido fueron fijadas en líquido de Bouin y guardadas hasta su análisis (24h). Además, muestras de mucosa de yeyuno, íleon y ciego fueron tomadas realizando un raspado de la superficie luminal con un cubreobjetos sobre una placa Petri en hielo (**Figura 15B**). Las muestras de mucosa fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta análisis.

**Figura 15.** Recogida de las muestras de intestino de los lechones

**Casetes de inclusión para realizar los cortes histológicos**

**Raspado de la mucosa intestinal**



Finalmente, los cerdos fueron sacrificados con una inyección intracardiaca de pentobarbital sódico (1 ml/kg).

### 3. MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.1 Análisis histológico de la mucosa intestinal

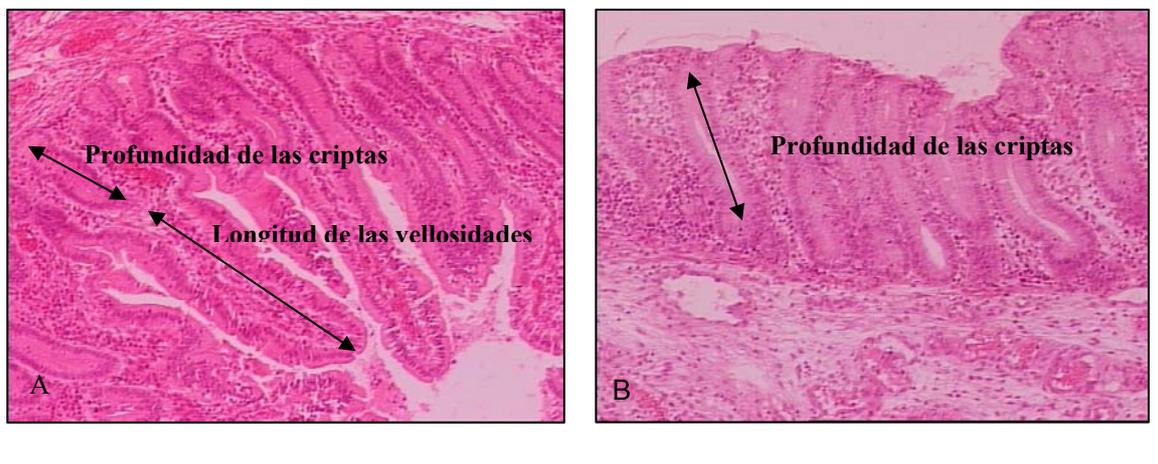
Las medidas de la morfología intestinal a nivel microscópico se realizaron con las muestras de tejido intestinal tomadas al 10, 25, 50, 75 y 90 por ciento de la longitud total del intestino delgado y se tomaron además dos muestras de tejido de ciego. Después de fijar las muestras de tejido intestinal en líquido de Bouin (75 ml de solución saturada de ácido pícrico en agua, 25 ml de formaldehído y 5 ml de ácido acético), el tejido se deshidrató con concentraciones crecientes de alcohol etílico en agua:

<b>Deshidratación</b>	<b>Tiempo</b>
Alcohol 70°	Indefinido
Alcohol 80°	1 h
Alcohol 96°	1 h
Alcohol absoluto I	1 h
Alcohol absoluto II	1 h
Alcohol absoluto III	1,5 h
Acetato de amilo I	1 h
Acetato de amilo II	1 h
Acetato de amilo III	1,5 h

Finalmente una sección de cada muestra fue embebida en parafina a 60°C durante toda la noche usando las técnicas estándar. Se realizaron secciones transversales de cada muestra con un microtomo y dos secciones fueron seleccionadas de cada región del intestino, teñidas con hematoxilina-eosina y examinadas con un microscopio óptico

Axioskop (Zeiss, Alemania). La longitud de las vellosidades intestinales y la profundidad de las criptas fue medida usando un programa de procesamiento de imágenes (Microm Image Processing, software 4.5). En el intestino delgado se midió la longitud y profundidad de al menos 10 vellosidades y criptas intestinales respectivamente, así como el número de células por longitud de vellosidad intestinal en cada sección histológica (**Figura 16A**). Las profundidades de al menos 20 criptas intestinales fueron medidas en las secciones histológicas de ciego (**Figura 16B**) (Van Dijk *et al.*, 2001).

**Figura 16.** (A) Sección transversal de intestino delgado de lechón a los 15 días de vida; (B) Sección transversal de ciego de un lechón a los 15 días de vida.



### 3.2 Análisis enzimáticos de la mucosa de yeyuno y ciego

Las muestras de mucosa de yeyuno y ciego fueron usadas para determinar la concentración de proteínas, actividades de las enzimas disacaridasas, fosfatasa alcalina (FA) y gamma glutamil transferasa ( $\gamma$ -GT).

#### 3.2.1 Determinación de proteínas

La concentración proteica de las muestras se realizó en mucosa de yeyuno y ciego por el método de Bradford (1979). Este método está basado en la formación de un

compuesto coloreado que presenta un máximo de absorción a 595 nm, cuando el Azul de Coomassie se combina con las proteínas.

### Reactivos

- Se utilizó como patrón una disolución de albúmina bovina fracción V de 0,5 mg/ml.

- Reactivo de Bradford: Se disolvieron 66,66 mg de Azul de Coomassie B-0770 en 50 ml de etanol 96%, y se añadieron 100 ml de ácido ortofosfórico 85% (p/v), dejando en agitación en oscuridad durante 24 horas. Posteriormente se filtró y se completó con cantidad suficiente de agua destilada hasta un volumen final de 1 litro.

- Solución de ClNa 0,15 M.

### Método

Se toma 10  $\mu$ l de una dilución 1/10 (v/v) de homogenado de mucosa intestinal y se le añade 1 ml de reactivo de Bradford, se agita inmediatamente y tras dos minutos se mide la densidad óptica a 595 nm. Paralelamente se prepara un blanco que contiene 100  $\mu$ l de solución de ClNa 0,15M.

La concentración de proteínas se obtiene interpolando en una curva patrón el valor de la absorbancia.

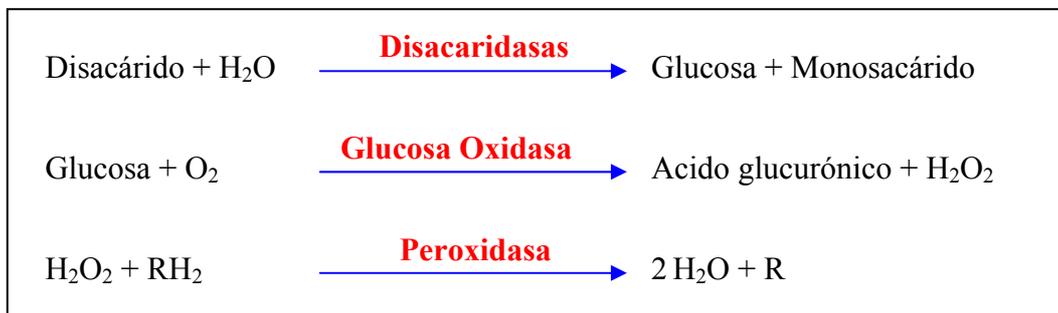
<b>Concentraciones de proteína para la curva patrón</b>	<b>Blanco</b>	<b>1 <math>\mu</math>g</b>	<b>2 <math>\mu</math>g</b>	<b>3 <math>\mu</math>g</b>	<b>5 <math>\mu</math>g</b>	<b>10 <math>\mu</math>g</b>	<b>15 <math>\mu</math>g</b>
<i>Albúmina 0,5 mg/ml (<math>\mu</math>l)</i>	0	2	4	6	10	20	30
<i>ClNa 0,15 M (<math>\mu</math>l)</i>	100	98	96	94	90	80	70
<i>Reactivo Bradford (ml)</i>	1	1	1	1	1	1	1

### 3.2.2 Enzimas marcadoras de la funcionalidad intestinal

- Determinación de las actividades de disacaridasas

Las actividades disacaridasas determinadas en la mucosa de yeyuno fueron las siguientes: lactasa, sacarasa y maltasa. El método seguido fue el descrito por Dahlqvist (1968), que consta de dos etapas: una primera, donde se efectúa la hidrólisis de los disacáridos por parte de las actividades disacaridasas y una segunda donde se determina la glucosa producida mediante la acción de la glucosa oxidasa y peroxidasa; la oxidación de la o-dianisidina por el peróxido de hidrógeno da un compuesto coloreado con un máximo de absorción a 420 nm. La intensidad de color obtenido es directamente proporcional a la cantidad de glucosa producida por unidad de tiempo y se considera como una estimación de la actividad disacaridasas.

La secuencia de reacciones en las que se fundamenta este método son las siguientes:



RH<sub>2</sub> es un compuesto reductor como la o-dianisidina.

#### Reactivos

- Tampón maleato sódico 0,1M, pH 6 (en este tampón se disolvieron los disacáridos ya que el ión sodio activa varias disacaridasas).

- Soluciones de disacáridos 56 mM.

- Tampón Tris 0,5M, pH 7 (en este tampón se realizó la determinación de glucosa, ya que inhibe la actuación de las disacaridasas).

- Detergente Tritón X-100 al 20% (p/v) en etanol.

- O-dianisidina 10 mg/ml.

- Peroxidasa 1 mg/ml.

- Reactivo de glucosa: 2 mg de glucosa oxidasa y 0,5 mg de peroxidasa se disuelven en 100 ml de tampón Tris, añadiéndose 1 ml de la solución de o-dianisidina y 1 ml de solución de Tritón (este reactivo es estable durante 5 días a 4°C).

- Solución estándar de glucosa 1 mg/ml.

### Método

Se pipetearon en tubos de ensayo 100 µl de la dilución del homogenado (1:2 en el caso de la determinación de actividades lactasa y sacarasa y 1:20 para la maltasa) y 100 µl de la solución del disacárido correspondiente, incubándose la mezcla 60 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 3 ml del reactivo de glucosa, incubándose nuevamente durante 60 min a 37°C, midiéndose la absorbancia a 450 nm.

Para cada ensayo se preparó un blanco con homogenado y reactivo de glucosa al que se añadió la solución de disacáridos, omitiéndose la primera incubación. Este tubo, llamado ciego tiene como objeto estimar la glucosa libre que como contaminante lleva la muestra y que por tanto debe ser restado del valor hallado en el tubo problema. Para obtener el blanco se sustituyó el homogenado por agua, tratándose de igual manera que las muestras problemas. La recta de calibrado se construyó con volúmenes diferentes de solución patrón de glucosa, siendo procesados de manera similar a la muestra.

Las actividades disacaridasas se expresaron en Unidades de actividad específica (U/mg proteína), siendo las Unidades expresadas como µmoles de glucosa hidrolizados por min.

- Determinación de la actividad fosfatasa alcalina

La actividad fosfata alcalina se determinó en mucosa de yeyuno y ciego por el

método de Rosalki *et al.* (1993) usando el kit de diagnóstico Biosystems (Barcelona, España). El método se basa en la capacidad de la enzima para descomponer el p-nitrofenilfosfato en presencia de agua produciendo p-nitrofenol y fosfato. El p-nitrofenol presenta un máximo de absorbancia a 405 nm.



### Reactivos

- Solución reactiva: Dietanolamina 1M, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, p-nitrofenilfosfato 10 mM, pH 9,8.

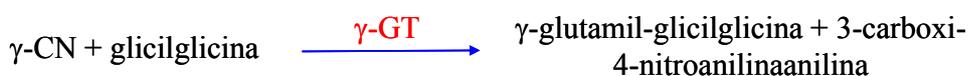
### Método

Se pipetearon 25 µl de muestra (1/100 en fosfato sódico 10 mM, pH 7,4), y la reacción se inició por la adición de 1,5 ml de la solución reactiva. Se midió la variación de la densidad óptica a 405 nm durante 5 min a 37°C.

Los resultados se expresaron en unidades de actividad específica (U/mg proteína).

- Determinación de la actividad  $\gamma$ -glutamil transferasa

La actividad  $\gamma$ -glutamil transferasa se determinó en mucosa de yeyuno y ciego por el método estándar de Szasz (1974), usando un kit de Biosystem. El método se basa en la capacidad de la enzima para descomponer la L- $\gamma$ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida ( $\gamma$ -CN) en presencia de glicina formándose un compuesto coloreado con un máximo de absorbancia a 405 nm, según la reacción:



### Reactivos

- Solución reactiva - Tampón Tris 100 mM,  $\gamma$ -CN 2,9 mM, glicilglicina 100 mM, pH 8,25.

### Método

En cubetas de 1 ml se ponen 50  $\mu$ l del homogenado de mucosa intestinal y se inicia la reacción con 500  $\mu$ l de la mezcla de reacción, siguiendo la variación de absorbancia a 405 nm durante 5 min a 37°C.

Los resultados se expresaron en unidades de actividad específica (U/mg proteína).

### **3.3 Determinación de poliaminas**

El contenido en poliaminas de las muestras de mucosa de yeyuno, íleon y ciego, así como del contenido cecal fueron cuantificadas según el método de Seiler modificado (Seiler, 1983). Las muestras de mucosa fueron homogenizadas (1:10, w:v) en ácido 5-sulfosalicílico (0,2 g/ml) y congeladas a -80°C durante toda la noche. El contenido cecal fue diluido con tampón salino (1:10, w:v) y centrifugado a 6700g durante 20 minutos. 500  $\mu$ l de ácido 5-sulfosalicílico (0,2 g/ml) fueron añadidos a 500  $\mu$ l de sobrenadante y congelados a -80°C durante toda la noche.

Después de centrifugar las muestras a 6700 xg durante 20 min, 50  $\mu$ l de 1,6-diaminohexano (estándar interno), 200  $\mu$ l de una solución saturada de carbonato sódico en agua y 400  $\mu$ l de cloruro de dansilo (10 mg/ml en acetona) fueron sucesivamente añadidos a 100  $\mu$ l del sobrenadante que previamente se había filtrado a través de un filtro de nylon de 0.45  $\mu$ m de diámetro de poro. Esta mezcla dansilada fue incubada durante toda la noche a temperatura ambiente. Los derivados dansilados fueron extraídos con 1,5 ml de ciclohexeno, secados y seguidamente resuspendidos en 100  $\mu$ l del medio de inyección (acetonitrilo:metanol 3:2, v:v).

Las poliaminas dansiladas fueron cuantificadas por cromatográfica líquida de alta resolución (HPLC) (Waters 1525) usando una columna en fase reversa (Nova-Pak C18,

Waters, España). Se uso un gradiente de dos fases, empezando con un flujo de 1 ml/min de la fase A al 57% (fase A: acetonitrilo:metanol 3:2; fase B: agua Milli Q), y llegando al 100% de la fase A después de 53 minutos. Se utilizó un detector de fluorescencia (Waters 2475), y se utilizaron las  $\lambda$  de 350 nm de excitación y 495 nm de emisión. Las poliaminas estándares (putrescina dihidroclorada; espermidina trihidroclorada y espermina tetrahidroclorada) fueron obtenidas de Sigma Chemical Co, St. Louis, MO.

### ***3.3.1 Determinación de poliaminas en leche de cerda***

Las muestras de leche de cerda fueron obtenidas de 10 animales en distintos días del periodo de lactancia. Las muestras de leche fueron congeladas a -80°C hasta el análisis de poliaminas.

200  $\mu$ l de una solución de ácido 5-sulfosalicílico (0,2 g/ml) y 50  $\mu$ l de 1,6-diaminohexano (estándar interno) fueron añadidos a 1ml de las muestras de leche y seguidamente fueron congeladas a -20°C durante toda la noche.

Se centrifugaron las muestras a 6700 xg durante 20 minutos, el precipitado resultante fue eliminado. El sobrenadante fue centrifugado otra vez a 6700 xg durante 10 minutos, y el sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro de nylon de 0,45 $\mu$ m de diámetro de poro. 70 $\mu$ l de tampón borato (pH 8,8) y 20  $\mu$ l de reactivo AccQ Flúor (Waters) fueron añadidos a 100  $\mu$ l de sobrenadante. La mezcla fue incubada en un baño de agua durante 10 minutos a 55°C. Las poliaminas derivatizadas fueron cuantificadas por HPLC (Waters 1525) usando una columna en fase reversa (Nova-Pak C18, Waters, España). Se uso un gradiente de dos fases, empezando con un 25% de fase A (fase A: acetato sódico 20mM; fase B: metanol), alcanzando el 100% de fase A después de 30 minutos, a una tasa de flujo de 1 ml/min. Se utilizó un detector de fluorescencia (Waters 2475), y se utilizaron las  $\lambda$  de 250 nm de emisión y 350 nm de excitación.

## 4. ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS

### 4.1 Recuentos, aislamientos y caracterización bacteriana

1,5 g de contenido cecal fueron añadidos a un tubo estéril con 13,5 ml de tampón salino con cisteína (0,5 g/L) (PBS-Cys). Después de homogeneizar el contenido cecal, se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-2}$  a  $10^{-8}$ ) en PBS-Cys. 10  $\mu$ l de cada dilución fueron sembrados en una placa en superficie por triplicado en medios selectivos (agar reforzado para clostridios, medio de Berens, agar Rogosa, agar MacConkey y agar Sabouraud dextrosa) y en medios no selectivos (agar Columbia y agar Wilkins-chalgren para anaerobios). El medio de cultivo, los microorganismos investigados, la composición de la fase gaseosa y el tiempo de incubación se detallan en la **tabla 13**.

**Tabla 13.** Medios de cultivo, tiempo y condiciones de incubación para cada grupo de microorganismo estudiado

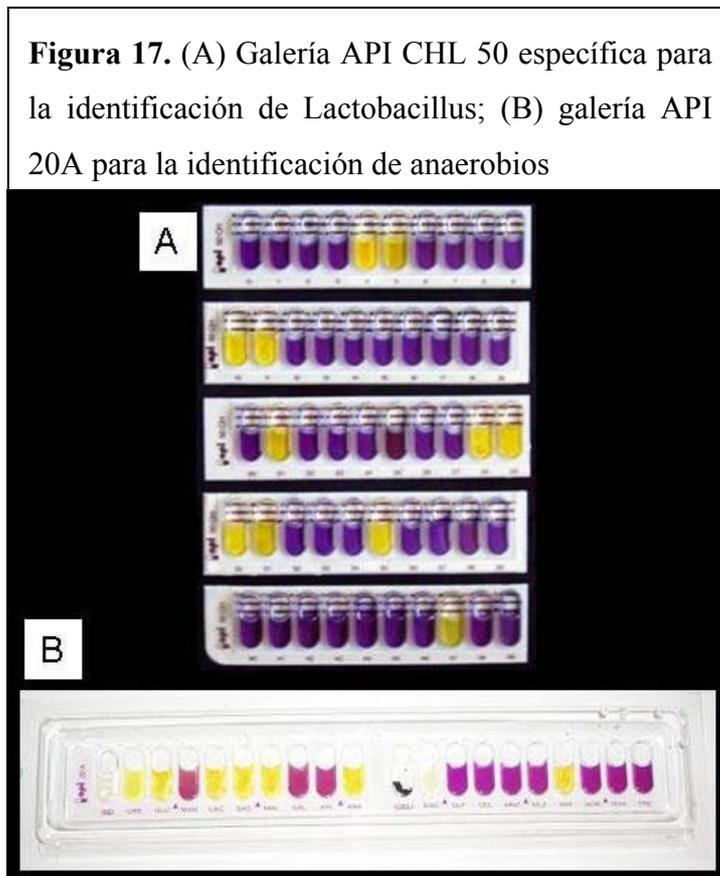
Microorganismos	Medios de cultivo	Atmósfera	Tiempo (h)
Aerobios totales	Base de agar Columbia sangre	O <sub>2</sub>	24
Anaerobios totales	Agar Wilkins-chalgren para anaerobios	CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub>	48
Clostridios	Agar reforzado para clostridios	CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub>	48
Coliformes y otras enterobacterias	Agar MacConkey n° 3	O <sub>2</sub>	24
Hongos y levaduras	Agar Sabouraud dextrosa modificado*	O <sub>2</sub>	24
Bifidobacterias	Medio Berens modificado†	CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub>	48
Lactobacilos	Agar Rogosa	Microaerofilia	48

\*El medio agar Sabouraud dextrosa fue modificado añadiendo 5 g/L de cloramfenicol

†Berens modificado contiene 47 g de agar infusión de cerebro y corazón (BHI-Agar), 5 g de glucosa, 0,5 g de citrato férrico, 0,5 g cisteína, y agua destilada hasta 1000 mL

Para conseguir las condiciones de anaerobiosis las placas se introducen en jarras de anaerobiosis usando generadores de anaerobiosis (Anaerogen de Oxoid). La microaerofilia se logró con sobres generadores de microaerofilia de la casa Oxoid. Las placas se incubaron en una estufa a 37°C.

Los resultados fueron expresados como log de las unidades formadoras de colonias (UFC)/g de contenido cecal seco. Varias cepas de lactobacilos y bifidobacterias fueron aisladas y purificadas en el mismo medio (agar Rogosa y medio de Berens, respectivamente) e identificadas usando las galerías de identificación API 20A para anaerobios y API CHL50 para lactobacilos (bioMerieux, Francia) (**Figura 17**), según las recomendaciones del fabricante.



#### 4.2 Producción de poliaminas bacterianas

Las cepas aisladas se investigaron con respecto a su capacidad de producción de

poliaminas. En este trabajo se ha adoptado el medio de Falkow como medio base para el estudio de producción de poliaminas por las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aisladas. Para ello, las cepas representativas de bifidobacterias y lactobacilos cuya abundancia fue potenciada por el consumo de FOS por los animales se inocularon en medio Falkow y medio Falkow suplementado con los aminoácidos arginina, lisina u ornitina (0,5% w/v), e incubadas a 37°C durante 72 h (MacFaddin, 1976). Este medio se utiliza en microbiología para determinar la capacidad descarboxiladora de aminoácidos en condiciones anaerobias en el trabajo rutinario de identificación de bacterias. Los aminoácidos lisina, ornitina y arginina son precursores conocidos de las poliaminas putrescina y cadaverina. Tras el periodo de incubación se realizó la detección y cuantificación de poliaminas mediante técnicas cromatográficas (HPLC) de la siguiente forma:

Se diluyeron 500 µl de cultivo con ácido 5-sulfosalicíco (1:1, v/v) y se continuó el análisis según el método de dansilación descrito anteriormente para el análisis de poliaminas en la mucosa intestinal (ver apartado 3.3).

#### **4.3 Estudio dosis-dependiente sobre la influencia de la concentración de FOS y la producción de poliaminas bacteriana**

Para estudiar la posible relación dosis-dependiente entre el consumo de FOS y la producción de poliaminas por las bacterias, se tomó el contenido cecal de los cerdos del grupo control y del grupo de animales suplementado con FOS y se inoculó en distintos tubos con medio Falkow y medio Falkow suplementado con el aminoácido ornitina (0,5% w/v) (precursor de la putrescina).

Se analizó la producción de poliaminas en dichos medios tras la adición de FOS (Raftilosa P95) a distintas concentraciones 0, 5, 10 y 15 g/L. Los tubos fueron incubados en condiciones de anaerobiosis durante un periodo de 72 h a 37°C. Tras el periodo de incubación se realizó la detección y cuantificación de poliaminas mediante técnicas cromatográficas (HPLC) de la forma indicada en el apartado anterior.

#### 4.4 Composición de los medios de cultivo

##### 4.4.1 Medio de Berens

El medio de Berens es un medio selectivo para el crecimiento de bifidobacterias.

Medio BHI-Agar (Oxoid)*	47,0 g
Glucosa	5,0 g
Citrato de hierro III	0,5 g
L-cisteína	0,5 g
Agua destilada	1 l
<b>pH 5,5±0,2</b>	

<b>*Agar de cerebro y corazón (BHI-Agar)</b>	
Infusión de cerebro de becerro	12,5 g
Infusión de corazón de ternera	5,0 g
Peptona proteosa	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Glucosa	2,0 g
Fosfato disódico	2,5 g
Agar	10,0 g
Agua destilada	1 l
<b>pH 7,4±0,2</b>	

##### Preparación

Suspender 47 g de medio BHI-agar, 5 g de glucosa, 0,5 g de citrato de hierro y 0,5 g de cisteína en 1 litro de agua destilada. Calentar y agitar hasta ebullición y hervir hasta

disolución total. Dejar enfriar hasta 60°C y conseguir un pH de 5,5 con sosa y ácido propiónico (el ácido propiónico hace que el medio sea selectivo para bifidobacterias). Distribuir asépticamente en placas estériles.

#### 4.4.2 Medio base de agar *Columbia sangre*

Se emplea para el cultivo de microorganismos en general y en particular de aquellos que son especialmente exigentes a partir de una amplia variedad de muestras. Se ha usado el medio de la casa Oxoid, ya preparado.

Peptona especial	23,0 g
Almidón	1,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Agar	10,0 g
Agua destilada	1 l
<b>pH 7,3±0,2</b>	

#### 4.4.3 Medio de *Falkow*

Este medio se utiliza en microbiología para determinar la capacidad descarboxiladora de aminoácidos en condiciones anaerobias en el trabajo rutinario de identificación de bacterias.

Peptona	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Glucosa	1,0 g
Purpura de bromocresol	0,02
Agua destilada	1 l
<b>pH 7,1±0,2</b>	

Preparación

Resuspender las cantidades indicadas en 1 litro de agua destilada, repartir en alícuotas y a cada una añadir un aminoácido distinto al 0,5% (Lys, Orn y Arg) excepto el blanco. Distribuir en tubos de rosca a razón de 15 ml por tubo y esterilizar a 121°C durante 15 minutos

El pH original o el resultado del metabolismo microbiano determina que el medio sea:

- Amarillo a  $\text{pH} \leq 5,2$  (fermentación de glucosa sin producción de aminos a partir de los aminoácidos).
- Púrpura intenso a  $\text{pH} \geq 6,8$  (fermentación de los aminoácidos incorporados al medio con producción de aminos que alcalinizan el medio).
- Medio sin inocular a pH 6,8 de color purpura.

**4.4.4 Medio agar MacConkey n°3**

Es un medio selectivo que da una excelente diferenciación entre coliformes y no fermentadores de lactosa, con inhibición de cocos gram +. Se ha usado el medio de la casa Oxoid, ya preparado.

Peptona	20,0 g
Lactosa	10,0 g
Sal biliar n°3	1,5 g
Cloruro sódico	5,0 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 l
<b>pH 7,1±0,2</b>	

Preparación

Suspender 51,5 g en 1 litro de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir hasta disolución total. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos y distribuir en placas. Conservar el medio preparado de 2-8°C.

**4.4.5 Medio agar reforzado para clostridios (Reinforced clostridial agar)**

Se emplea para el cultivo y recuento de anaerobios, especialmente Clostridios, en todo tipo de materiales a investigar (de la casa Oxoid).

Extracto de levadura	3,0 g
Polvo "Lab-Lemco"	10,0 g
Peptona	10,0 g
Glucosa	5,0 g
Almidón soluble	1,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Acetato sódico	3,0 g
Hidrocloreuro de cisteína	0,5 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 l
<b>pH 6,8±0,2</b>	

Preparación

Disolver 52,5 g en 1 litro de agua destilada. Calentar y agitar hasta disolución total. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 45°-50°C y verter en placas esteriles.

#### 4.4.6 Medio agar Rogosa (Rogose agar)

Se emplea para el cultivo selectivo de Lactobacilos (medio de la casa Oxoid).

Triptona	10,0 g
Extracto de levaduras	5,0 g
Glucosa	20,0 g
Sorbitan mono-oleato	1,0 g
Potasio dihidrógeno fosfato	6,0 g
Citrato amónico	2,0 g
Acetato sódico	25,0 g
Sulfato magnésico	0,575 g
Sulfato de manganeso	0,12 g
Sulfato férrico	0,034 g
Agar	
Agua destilada	1 l
<i>pH 5,4±0,2</i>	

#### Preparación

Suspender 75 gde medio en 1 litro de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y disolución total. Añadir 1,32 ml de ácido acético al 96% y mezclar bien. Calentar hasta 90°-100°C durante 2 minutos. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Distribuir asépticamente.

#### 4.4.7 Agar Wilkins-chalgren para anaerobios (Wilkins-Chalgren anaerobe)

Medio para el cultivo y para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de las bacterias anaerobias (de la casa Oxoid).

Triptona	10,0 g
Peptona de gelatina	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Glucosa	1,0 g
Cloruro sodico	5,0 g
L-arginina	1,0 g
Piruvato sódico	1,0 g
Menadiona	0,0005
Haemina	0,005
Agua destilada	1 l
<b><i>pH 7,1±0,2</i></b>	

#### Preparación

Suspender 33 g de medio en 1 litro de agua destilada. Calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 55-50°C y distribuir en placas de Petri estériles.

El extracto de levadura asegura el buen crecimiento de *Peptostreptococcus anaerobius* y *Bacteroides melaninogenicus*. La arginina para asegurar suficientes aminoácidos necesarios para el crecimiento de *Eubacterium lentum*. El piruvato está presente como fuente de energía para cocos como *Veillonella*. La hemina es esencial para el crecimiento de especies de Bacteroides y la menadiona para *B. melaninogenicus*.

#### **4.4.8 Medio agar dextrosa Sabouraud (Sabouraud dextrose agar)**

Los medios Sabouraud se emplean para el cultivo de hongos y levaduras y para la numeración de estos microorganismos en alimentos, muestras clínicas y otros

materiales. El agar Sabouraud con dextrosa está especialmente indicado para dermatófitos.

Peptona micológica	10,0 g
Glucosa	40,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 l
<b><i>pH 5,6±0,2</i></b>	

### Preparación

Suspender 65 g en 1 litro de agua destilada y añadir 5 g/L del antibiótico cloranfenicol. Calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

## **5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  EEM para determinar el efecto de la dieta como fuente de variación. Se usaron los tests no paramétricos de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney cuando los datos no mostraron una distribución normal según los tests estadísticos de Levene y Kolmogorov-Smirnov. Cuando los datos mostraron una distribución normal se realizó una T-student y un test ANOVA con un test de Bonferroni a posteriori. Las correlaciones entre los parámetros histológicos y las actividades enzimáticas por un lado, y las concentraciones de poliaminas por otro, fueron evaluadas usando el test de correlación de Pearson. Un test ANOVA de doble vía fue usado para determinar el estudio dosis-dependiente de FOS entre los dos grupos de animales (grupo control y grupo FOS). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P < 0,05$ . Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo usando el programa estadístico SPSS para Windows (versión 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## *IV. Resultados*



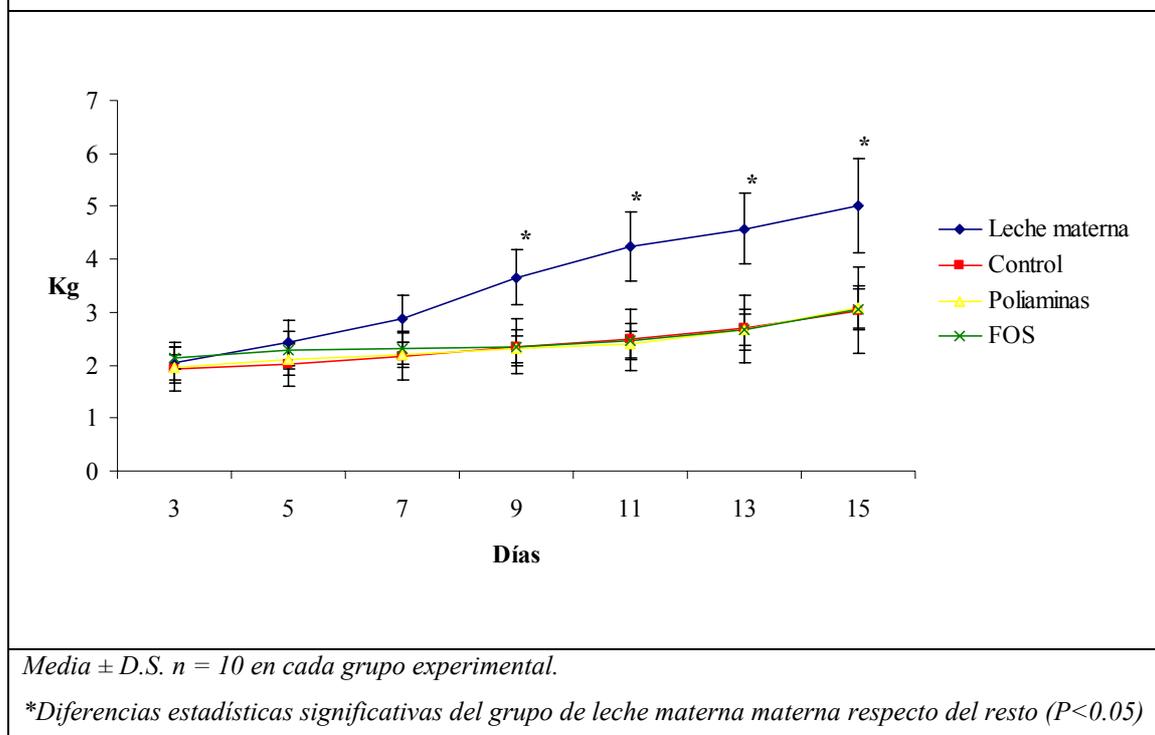
The singing fish, Miró



## 1. PESOS DE LOS ANIMALES

En la **figura 18** se detalla la evolución del peso de los distintos grupos de animales durante los experimentos. Todos los tratamientos utilizados produjeron incrementos de peso de mayor o menor importancia y todos muy parecidos entre si menos en el grupo de animales alimentado con leche materna que presentó el mayor crecimiento.

**Figura 18.** Peso de los grupos de animales alimentados con distintas dietas

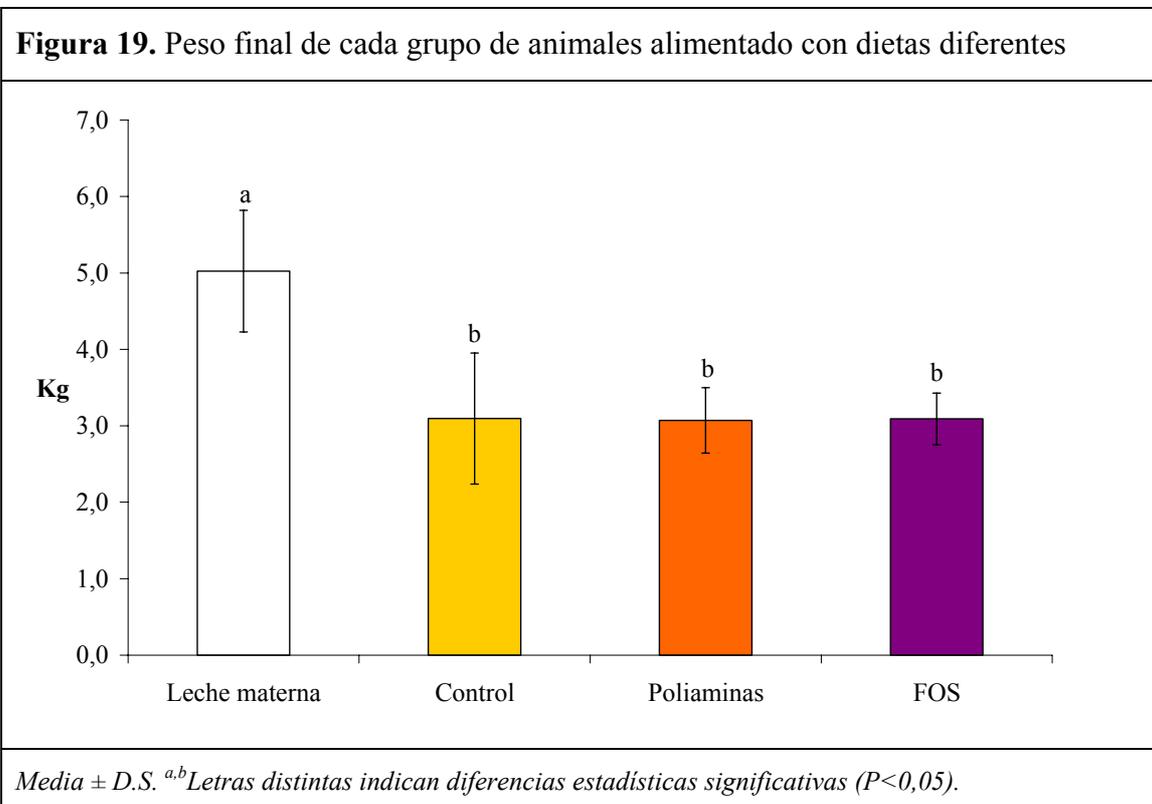


Los animales alimentados con las fórmulas no mostraron diferencias estadísticas en los pesos entre el día 3 y el día 15. El grupo de animales alimentado con leche materna presentó un peso mayor a partir del día 9 con respecto a los grupos de animales alimentados con las fórmulas, siendo las diferencias estadísticamente significativas (**Figura 18**). Ninguno de los cuatro grupos de animales sufrió pérdida de peso al final del tratamiento. Todos los animales sobrevivieron durante el experimento de forma saludable aunque 10 de los 30 animales alimentados con las distintas fórmulas sufrieron del 5° al 7° día de vida procesos diarreicos.

En la **figura 19** se representa la media del peso final alcanzado por los animales de cada grupo experimental (n=10) alimentados con dietas diferentes. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los pesos de los animales entre el grupo de leche materna y el resto de grupos, pero no entre los animales que fueron alimentados con las distintas fórmulas lácteas ensayadas (**Figura 19**).

El menor peso alcanzado en los animales alimentados con las fórmulas podría ser debido a la adaptación o estrés que sufren los animales al separarlos de la madre, a que la leche materna es el alimento óptimo y contiene más micronutrientes y a que los animales alimentados con leche materna comieron a demanda mientras que el resto de animales siguieron un protocolo nutricional.

Asimismo, no puede descartarse la acción inmunoprotectora de la leche materna a diferencia de las otras dietas. De hecho, ya se ha indicado más arriba que aproximadamente un 30% de los animales alimentados con fórmula padecieron episodios de diarrea, lo que afectó a los promedios de peso.



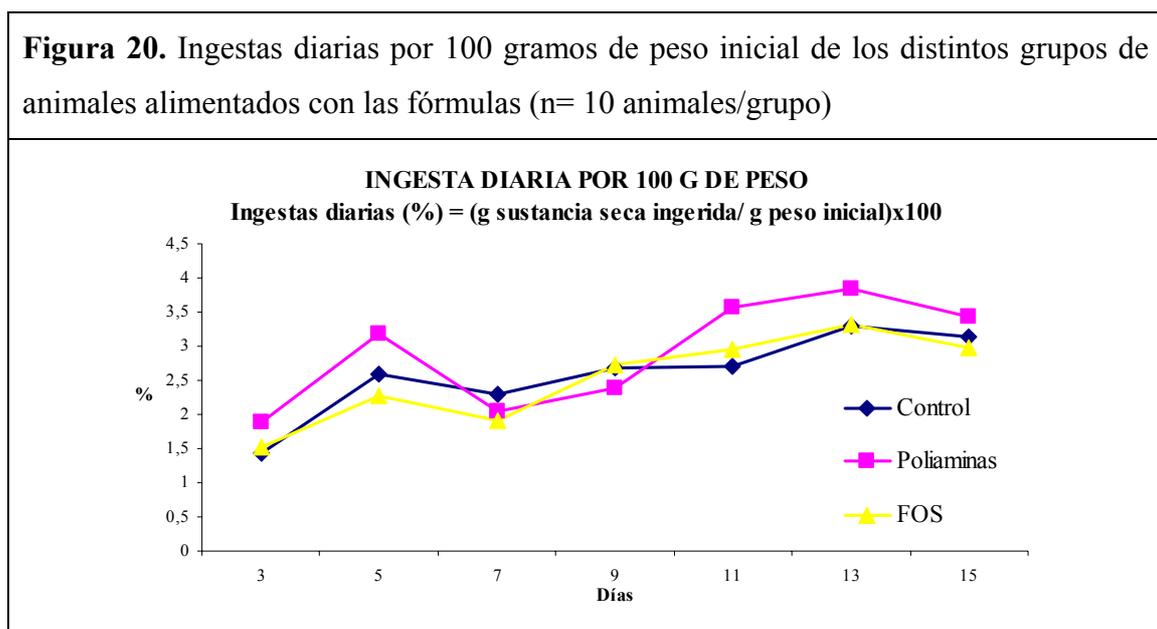
## 2. INGESTAS DE LOS ANIMALES

Con respecto a la cantidad de alimento ingerido por los distintos grupos de animales, no se observaron diferencias significativas en los mililitros de leche totales ingeridos, ni en el volumen de las ingestas medias diarias de los animales alimentados con las fórmulas (n=30) (**Tabla 14**). Las ingestas diarias de fórmula fueron similares en volumen a las descritas por Howard et al, 1995b.

<b>Tabla 14.</b> Ingesta total de fórmula reconstituída en los distintos grupos de animales		
<b>GRUPO</b>	<b>Ingesta total (ml)</b>	<b>Ingesta diaria (ml/día)</b>
CONTROL (n=10)	5671 ± 1872	412 ± 149
POLIAMINAS (n=10)	6287 ± 864	417 ± 55
FOS (n=10)	5874 ± 818	451 ± 74

*Los valores son la media ± D.S.*

En la **figura 20** se expresa la cantidad de alimento ingerido respecto al peso de los animales.



Las ingestas de los tres grupos de animales se vió disminuída del quinto día al séptimo, lo cual coincide con el proceso diarreico que sufrieron 10 de los 30 animales que fueron alimentados con las fórmulas. Al comparar estos datos relativos a la ingesta temporal de los animales, no se observaron diferencias significativas durante el tiempo que duró el estudio.

### 3. MATERIAL CECAL

Se tomaron muestras del contenido cecal de los cerdos sacrificados a las que se les midió la conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) y el pH, pero no se observó ninguna diferencia significativa entre los animales alimentados con las distintas dietas por lo que respecta a estos dos parámetros.

<b>Tabla 15.</b> Valores promedio y desviación estándar de la conductividad y pH del contenido cecal de los cerdos alimentados con las distintas dietas		
<b>DIETAS</b>	<b>pH</b>	<b>CONDUCTIVIDAD</b> ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
MATERNA (n=6)	6,7 $\pm$ 0,13	21425 $\pm$ 4777
CONTROL (n=5)	6,3 $\pm$ 0,75	19000 $\pm$ 2821
POLIAMINAS (n=10)	6,8 $\pm$ 0,45	19320 $\pm$ 2147
FOS (n=8)	6,4 $\pm$ 0,59	18162 $\pm$ 3364

*Los valores son la media  $\pm$  D.S.*

### 4. RESULTADOS EN INTESTINO DELGADO

Ya que los FOS no se metabolizan hasta llegar al intestino grueso, las medidas realizadas en el grupo de animales alimentado con la fórmula suplementada con FOS no se describen para las determinaciones en intestino delgado.

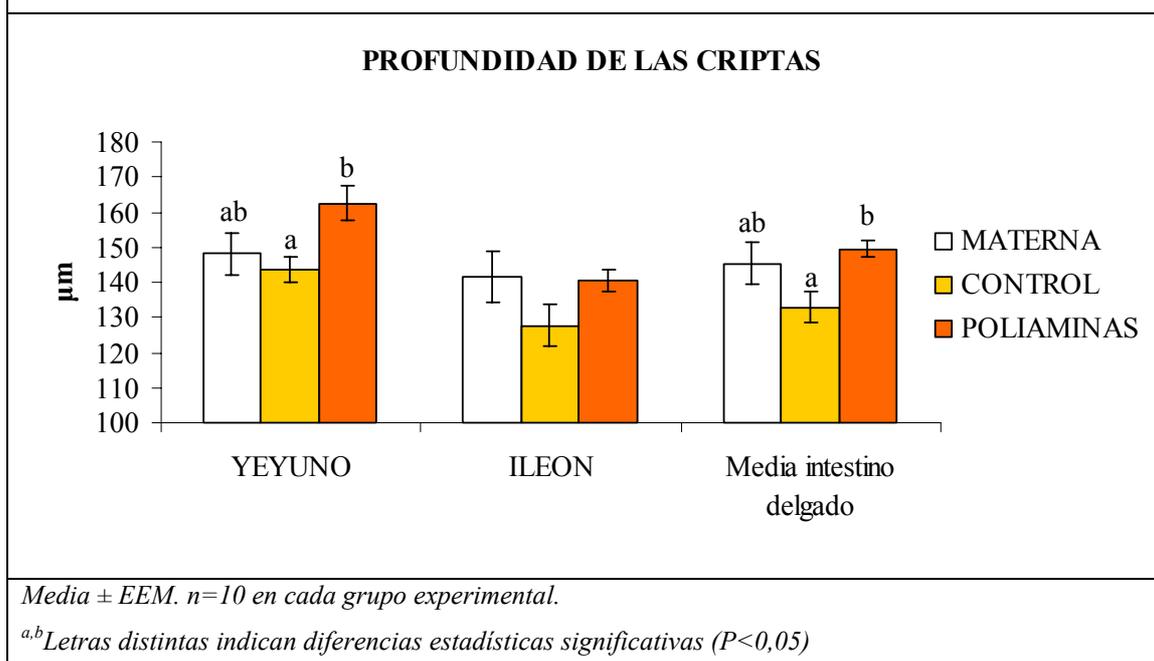
#### 4.1 Histología del intestino delgado

A nivel microscópico se realizaron cortes histológicos en distintas partes del intestino delgado y se procedió a la medida de la profundidad de las criptas, la longitud de las vellosidades intestinales y el número de células por vellosidad.

##### 4.1.1 Medida de la profundidad de las criptas intestinales

La medida de la profundidad de las criptas se vió significativamente aumentada por la ingesta de poliaminas (**Figura 21**).

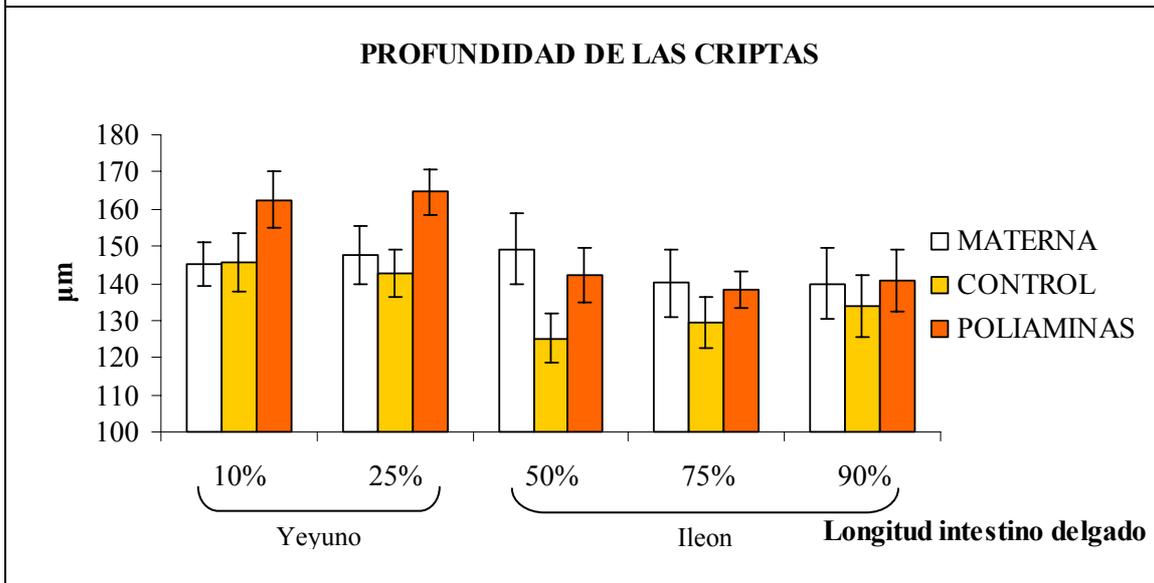
**Figura 21.** Profundidad de las criptas intestinales en los grupos de animales alimentados con las distintas dietas



Se observa que el grupo de animales alimentado con poliaminas presentó mayor profundidad de las criptas respecto al grupo control a lo largo de todo el intestino delgado, siendo las diferencias estadísticamente significativas en la región de yeyuno donde tiene lugar una mayor absorción de nutrientes, así como la media de todas las medidas efectuadas en el intestino delgado.

Las medidas de la profundidad de las criptas realizadas en cada tramo del intestino delgado se muestran en la **figura 22**. Se detectó mayor profundidad en las criptas intestinales en el grupo de animales alimentado con poliaminas respecto al grupo control y las diferencias fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, al incluir el grupo de leche materna en el análisis estadístico, las medidas de las profundidades de las criptas fueron similares al grupo de leche materna en la región del íleon (50%, 75%, 90%) y solo tendencia a mayores niveles en la región de yeyuno (10% y 25%) (**Figura 22**).

**Figura 22.** Profundidad de las criptas intestinales de cada sección de intestino delgado en los grupos de animales alimentados con las distintas dietas



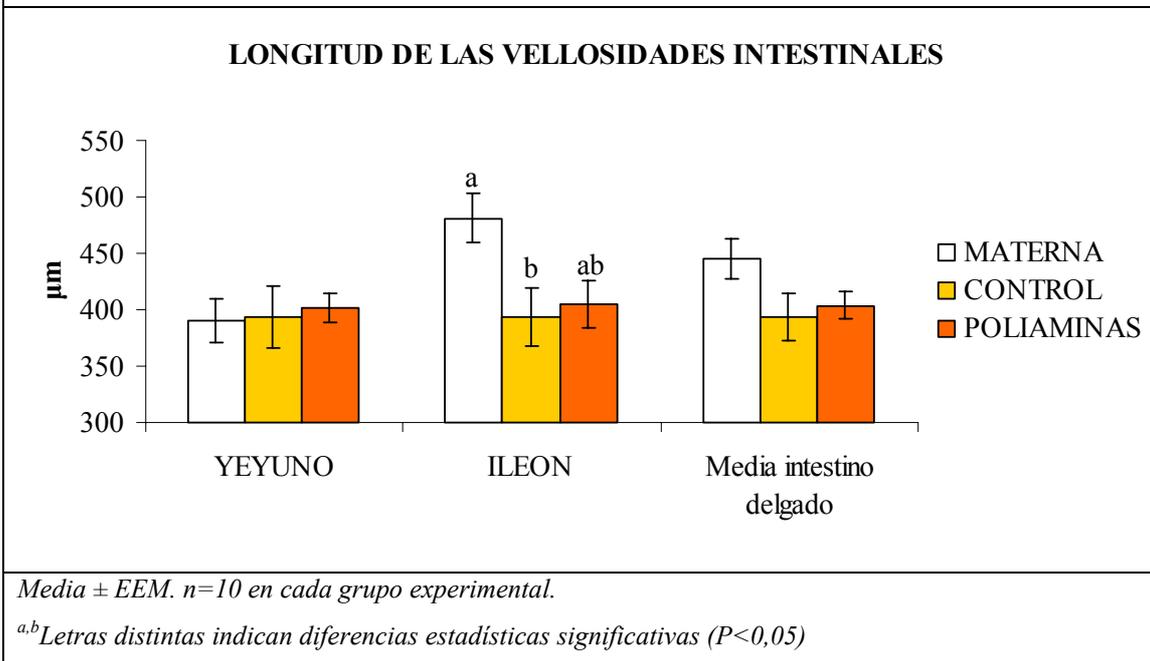
Media ± EEM. n=10 en cada grupo experimental.

No se apreciaron diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,05$ )

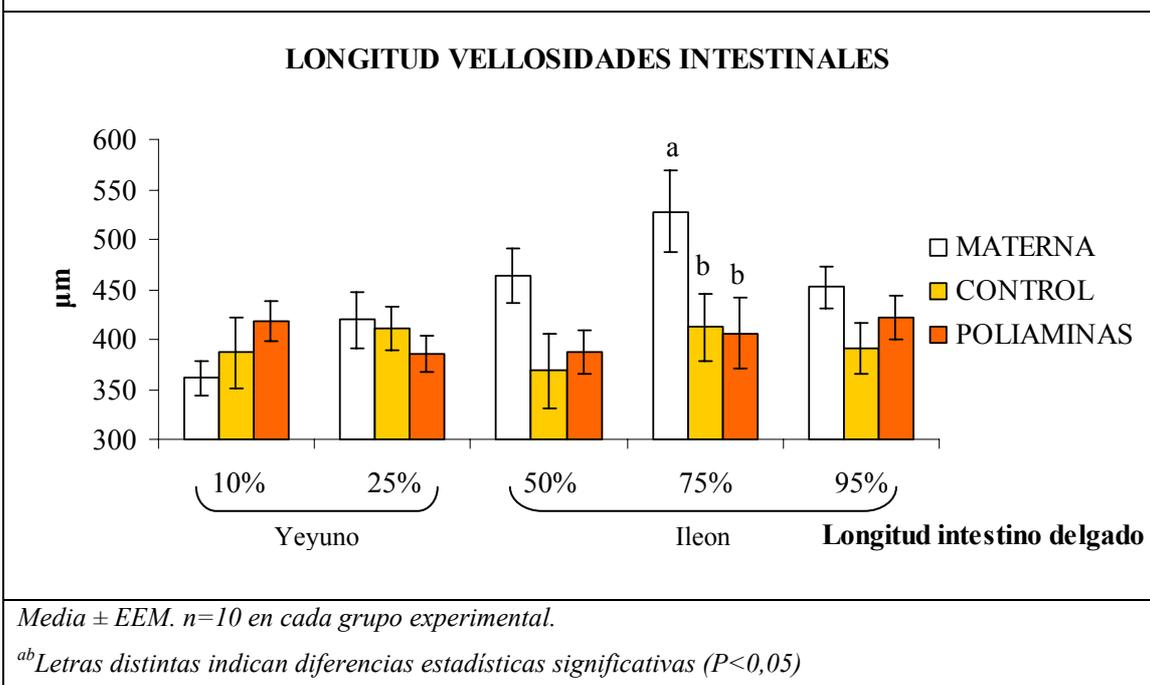
#### 4.1.2 Medida de la longitud de las vellosidades intestinales

No se apreciaron diferencias estadísticas significativas en la longitud de las vellosidades intestinales entre los grupos de animales alimentados con las fórmulas, aunque sí pudimos apreciar una tendencia a una mayor longitud de las vellosidades intestinales en el caso de los animales alimentados con la fórmula suplementada con poliaminas con respecto al grupo control (**Figura 23**).

**Figura 23.** Longitud de las vellosidades intestinales de los grupos de animales alimentados con las distintas dietas



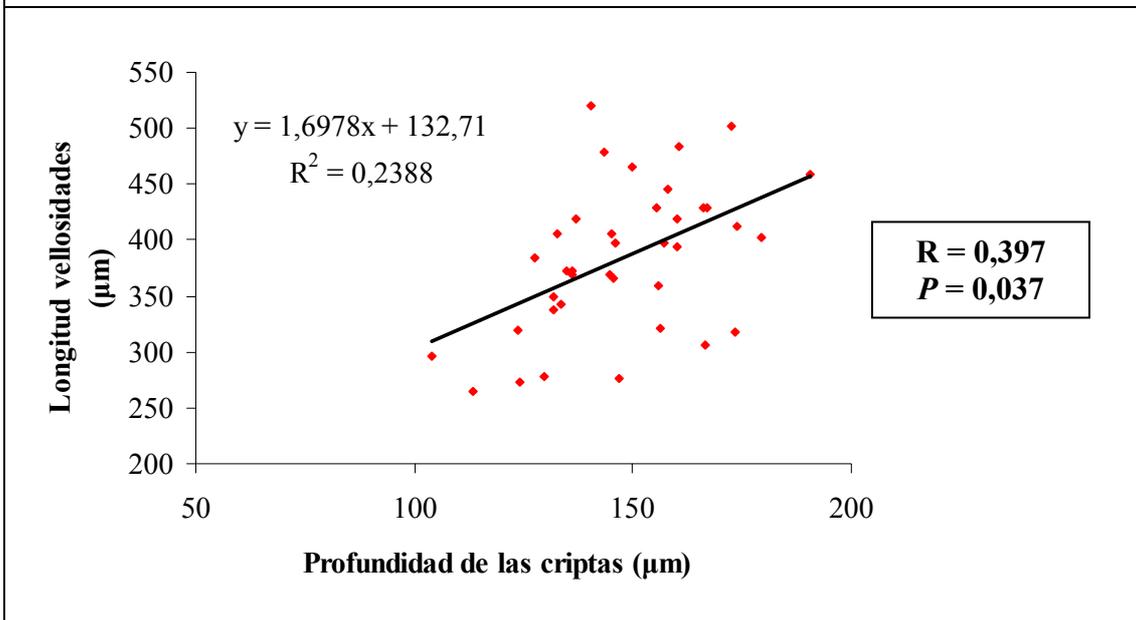
**Figura 24.** Longitud de las vellosidades intestinales de cada sección de intestino delgado de los grupos de animales alimentados con las distintas dietas



En la **figura 24** podemos observar que la longitud de las vellosidades intestinales en cada tramo de intestino delgado tiende a ser mayor en el grupo de animales alimentados con leche materna con respecto a los grupos alimentados con las fórmulas, no obstante sólo se observaron diferencias estadísticas significativas al 75% de la longitud total del intestino delgado, en la zona del íleon.

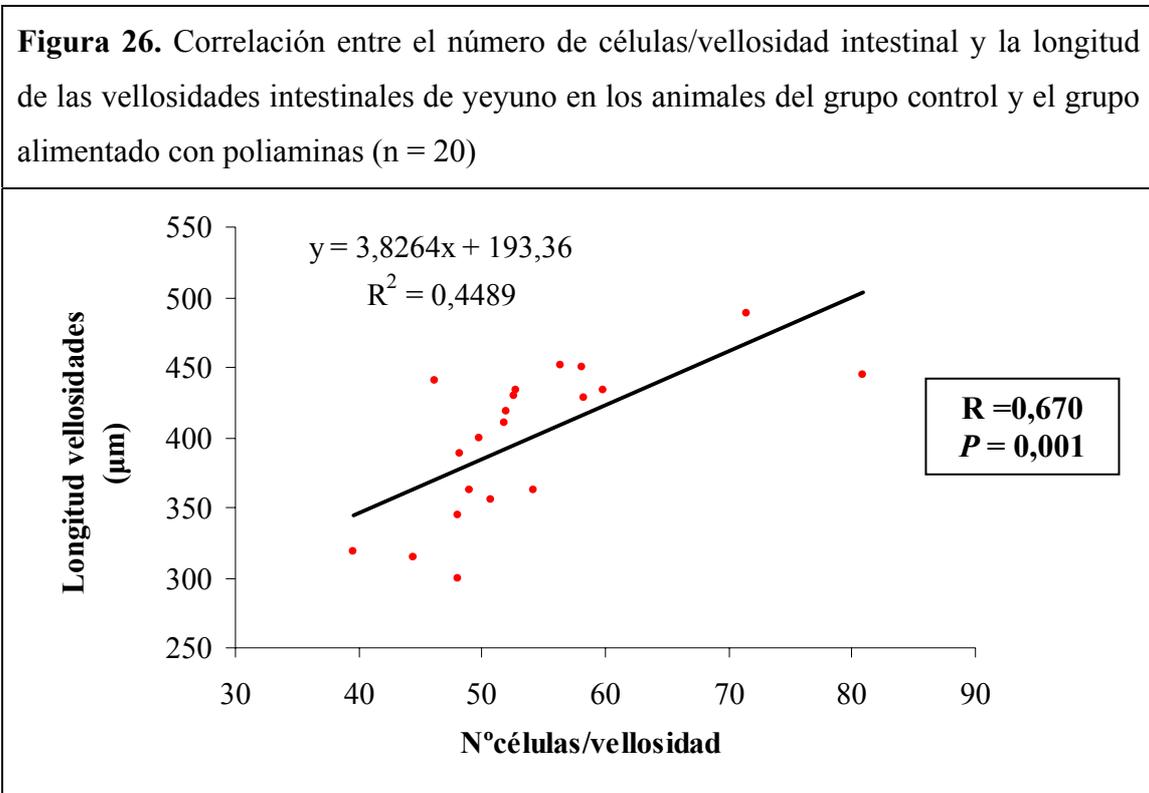
Las longitudes de las vellosidades intestinales a nivel de yeyuno presentaron una correlación positiva con las medidas de la profundidad de las criptas a nivel de yeyuno ( $R=0,397$ ,  $P=0,037$ ), lo que nos indica que la acción de las poliaminas no sólo se observó a nivel de la medida de la profundidad de las criptas, sino también se vio reflejada en la longitud de las vellosidades intestinales del yeyuno (**Figura 25**).

**Figura 25.** Correlación entre la medida de la profundidad de las criptas y la longitud de las vellosidades intestinales de yeyuno en los animales alimentados con diferentes dietas (n = 40)



El número de células por vellosidad intestinal también aumentó en el grupo de animales alimentados con poliaminas con respecto al grupo control en la región de yeyuno aunque no se observaron diferencias estadísticas significativas ( $55,34 \pm 1,15$  vs  $51,91 \pm 2,88$  células/vellosidad). Como era de esperar, el número de células/vellosidad

se correlacionó positivamente con la longitud de las vellosidades intestinales del intestino delgado ( $R = 0,670$ ,  $P = 0,001$ ) (**Figura 26**).



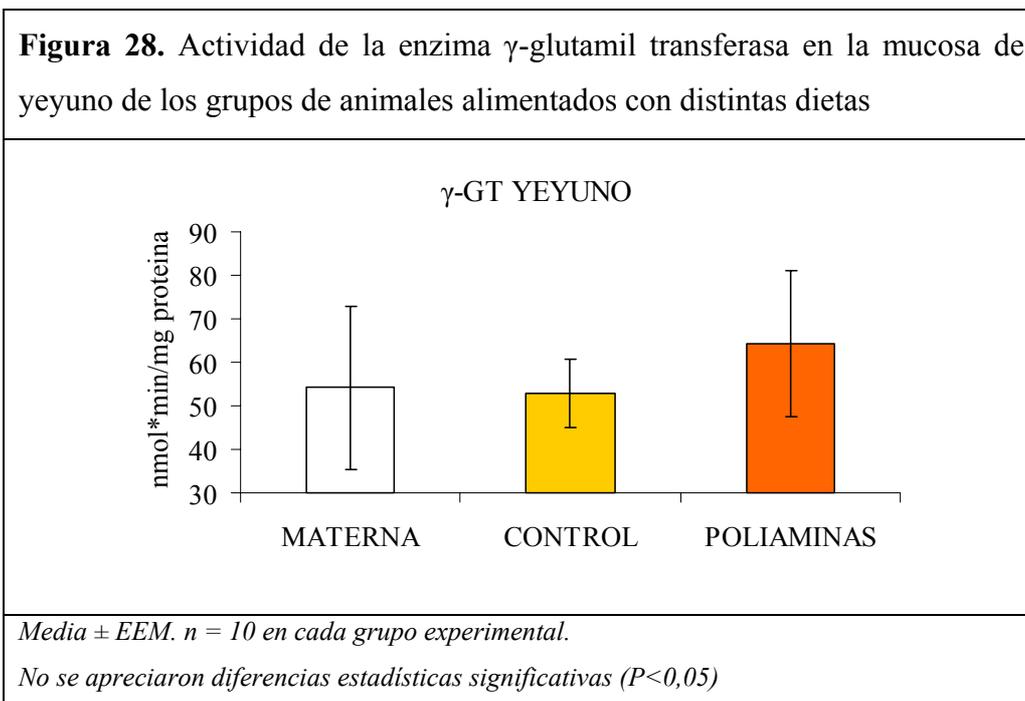
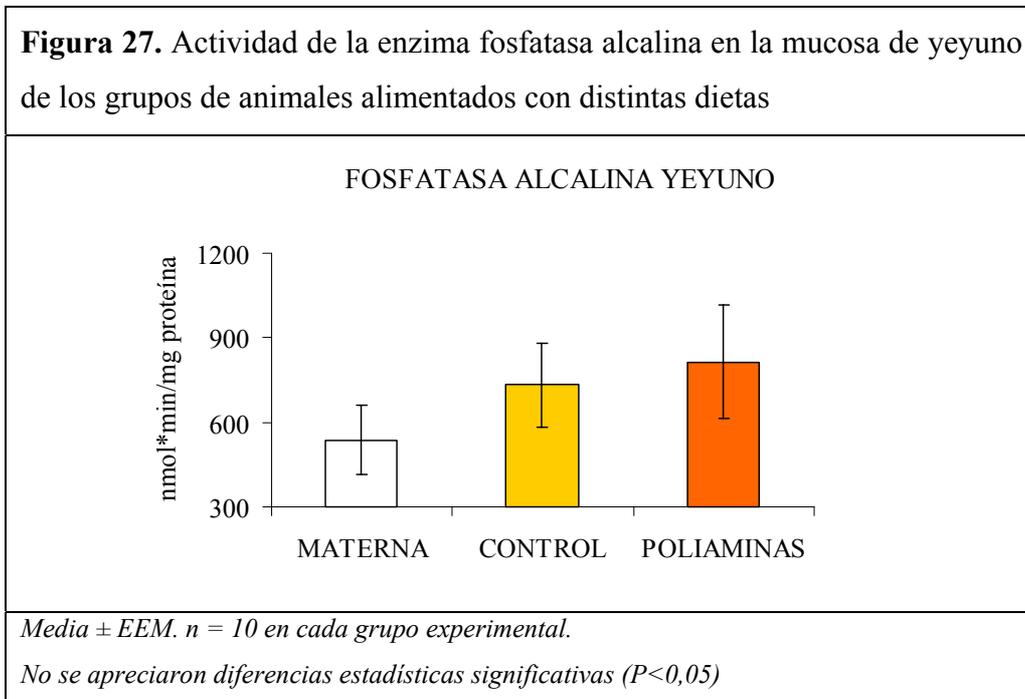
## 4.2 Actividades enzimáticas en mucosa de intestino delgado

A nivel de yeyuno se midieron las actividades fosfatasa alcalina y la  $\gamma$ -GT (**Figuras 27 y 28**), así como las actividades disacaridasas, sacarasa, lactasa y maltasa (**Tabla 16**) para ver si los cambios histológicos en el intestino delgado implicaron además un cambio en las actividades enzimáticas de las vellosidades del mismo.

### 4.2.1 Actividades fosfatasa alcalina y $\gamma$ -glutamil transferasa

Las actividades fosfatasa alcalina y  $\gamma$ -GT de la mucosa de yeyuno fueron más elevadas en el grupo de animales alimentado con poliaminas con respecto al grupo alimentado con leche materna y el grupo control, pero no se apreciaron diferencias

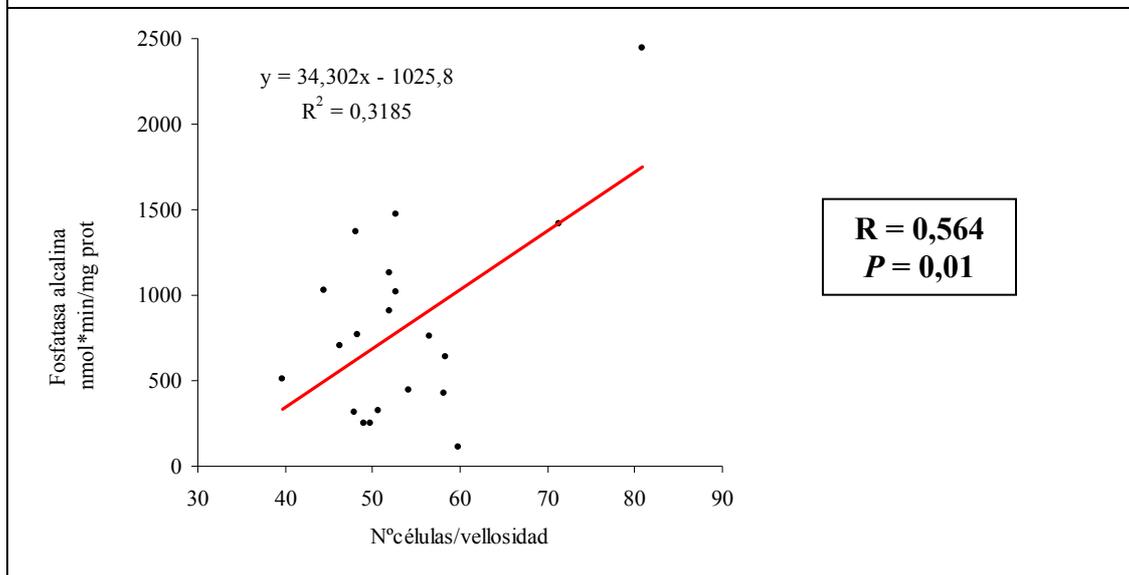
estadísticas significativas (**Figuras 27 y 28**). La medida de la actividad de estas enzimas de membrana se usa para corroborar cambios en la funcionalidad y maduración de las membranas biológicas.



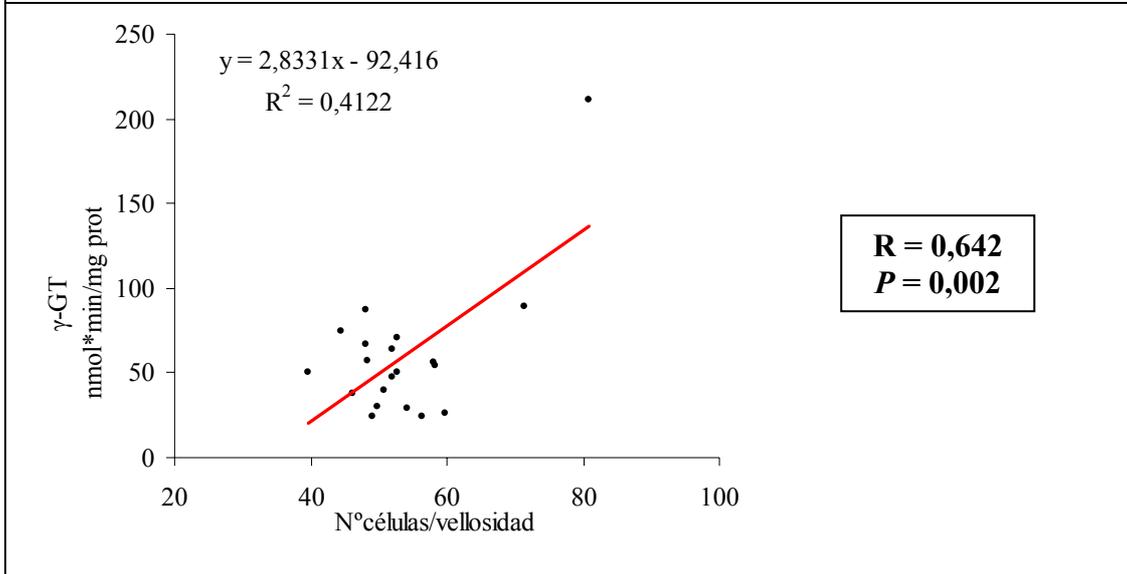
La actividad fosfatasa alcalina mostró una media mayor en los animales alimentados con poliaminas, aunque no se observaron diferencias estadísticas significativas (**Figura 27**). Las actividad  $\gamma$ -glutamil transferasa igualmente mostró una tendencia a valores mayores en el grupo de animales alimentado con poliaminas con respecto al resto de grupos, aunque no se observaron diferencias estadísticas significativas (**Figura 28**).

La actividad de estas enzimas se correlacionó positivamente con la medida del número de células/vellosidad en la región de yeyuno ( $R = 0,564$ ,  $P = 0,01$  y  $R = 0,642$ ,  $P = 0,002$ , respectivamente) (**Figuras 29 y 30**). No obstante si se observan las **figuras 29 y 30** se aprecia que las correlaciones son débiles ya que están sesgadas por las medidas realizadas en uno o dos de los animales.

**Figura 29.** Correlación entre el número de células/vellosidad y la actividad fosfatasa alcalina de la mucosa de yeyuno en los animales del grupo control y del grupo alimentado con poliaminas ( $n = 20$ ).



**Figura 30.** Correlación entre el número de células/vellosidad y la actividad  $\gamma$ -glutamyl transferasa de la mucosa de yeyuno en los animales del grupo control y el grupo alimentado con poliaminas (n = 20)



Puede que debido a los procesos diarreicos que sufrieron algunos de los animales alimentados con las fórmulas así como el corto periodo de alimentación al que fueron sometidos, o al limitado número de animales usados, haya dificultado que no se lleguen a apreciar diferencias significativas en el efecto que tuvieron las poliaminas a nivel de las actividades de las enzimas intestinales y que solo se observe una tendencia.

Es importante destacar también, el hecho de que no haya diferencias en las actividades enzimáticas entre los dos grupos de animales alimentados con la fórmula y el grupo de leche materna, así como que los niveles de estas enzimas sean más elevados en el grupo de animales suplementado con poliaminas ya que la leche materna es el alimento óptimo para el recién nacido, y toda fórmula intenta imitarla en su composición.

#### 4.2.2 Actividades de las enzimas disacaridasas

En el hombre, como en casi todos los mamíferos, la lactosa es el monosacárido que predomina en la leche y aporta una buena parte de la energía diaria en la dieta de los

recién nacidos, por lo que la lactasa intestinal tiene particular importancia en la nutrición de los niños lactantes. No menos importantes son las enzimas sacarasa y maltasa, que se encargan de la digestión de los disacáridos: sacarosa y maltosa, aunque la actividad de estas enzimas es menor durante el periodo de lactancia (Gómez *et al.*, 2007).

Las actividades de las enzimas disacaridasas no presentaron diferencias estadísticas entre los tres grupos de animales alimentados con las distintas dietas, con excepción de la actividad de la enzima sacarasa que fue menor en el grupo de animales alimentado con poliaminas con respecto al grupo de leche materna (**Tabla 16**).

<b>Tabla 16.</b> Actividades de las enzimas disacaridasas en la mucosa de yeyuno			
	<b>MATERNA</b>	<b>CONTROL</b>	<b>POLIAMINAS</b>
Maltasa (U/mg prot)	82,8±15,9	72,7±8,8	53,7±9,8
Sacarasa (U/mg prot)	21,6±6,8 <sup>a</sup>	12,4±2,4 <sup>ab</sup>	4,9±0,9 <sup>b</sup>
Lactasa (U/mg prot)	218,5±67,8	308,4±71,7	243,6±37,4

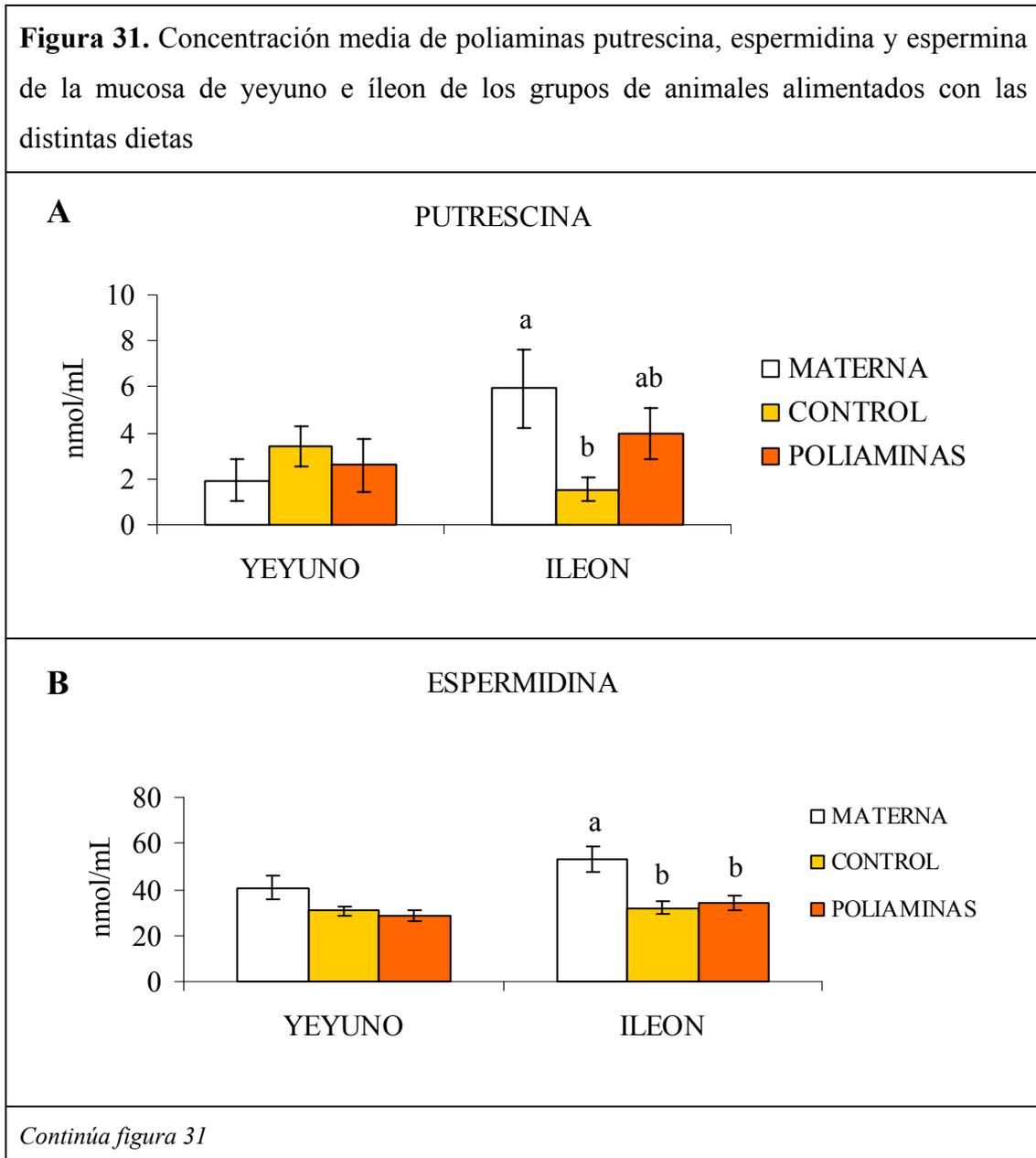
*Media ± EEM. n = 10 en cada grupo experimental.*  
<sup>a,b</sup>Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre la distintas dietas ( $P < 0,05$ )

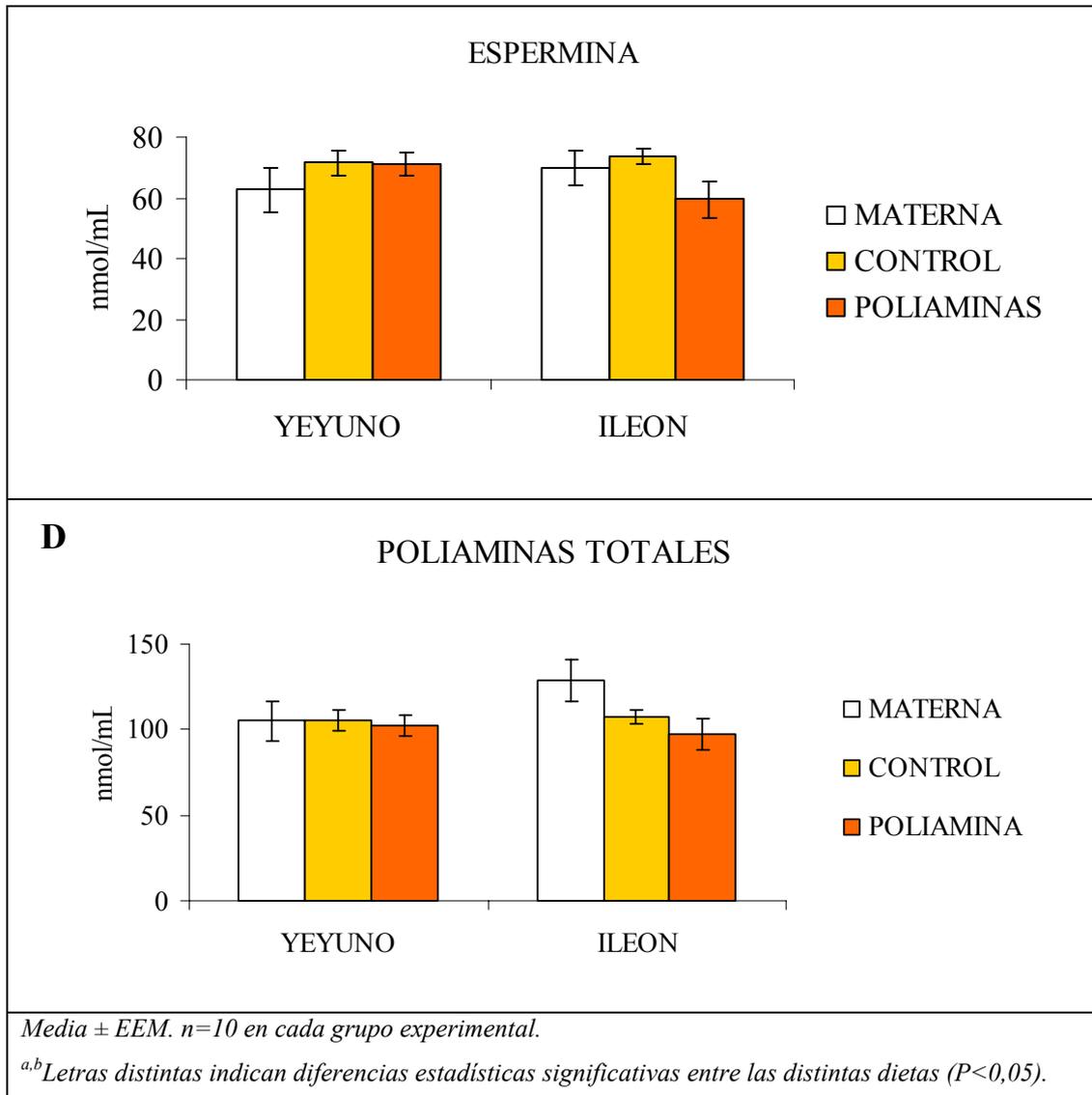
### 4.3 Análisis de poliaminas en intestino delgado

Se determinó el contenido en poliaminas, putrescina, espermidina y espermina, en las mucosas de yeyuno e íleon de los animales sacrificados (**Figura 31**).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de poliaminas en la zona de yeyuno entre los distintos grupos de animales. El hecho de que no aparezcan diferencias en el contenido de poliaminas en el intestino delgado entre los dos grupos de animales alimentados con las fórmulas podría ser debido al periodo de ayuno al que fueron sometidos los animales antes de ser sacrificados. De hecho, no se

observaron diferencias en el contenido total de poliaminas, incluso entre los cerdos alimentados con leche materna y con la fórmula control.





Los niveles de putrescina en la mucosa de íleon fueron mayores en el grupo de animales alimentado con leche materna con respecto al control, pero no se observaron diferencias estadísticas significativas entre el grupo de animales alimentado con leche materna y el grupo suplementado con poliaminas.

Los niveles de espermidina fueron significativamente mayores en el grupo de animales alimentados con leche materna respecto a los grupos alimentados con las fórmulas (**Figura 31B**), pero sin embargo no se observaron diferencias entre los tres grupos en el contenido de poliaminas totales o de espermina (**Figura 31C y 31D**).

Así pues el contenido total de poliaminas en intestino delgado fue muy similar entre los tres grupos de animales.

## 5. RESULTADOS EN INTESTINO GRUESO

En los resultados obtenidos del intestino grueso no se incluye el grupo de animales alimentados con la fórmula suplementada con poliaminas ya que está ampliamente descrito que las poliaminas no alcanzan este tramo de intestino al ser absorbidas totalmente en el intestino delgado.

### 5.1 Resultados microbiológicos en ciego

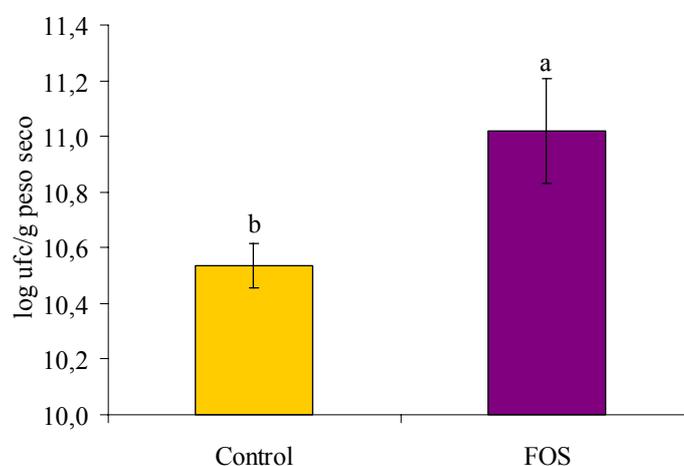
En las **figuras 32-38** no se incluye el grupo de leche materna porque las condiciones ambientales (parideras) en las que estuvieron estabulados estos animales no son comparables con las de los animales alimentados con las fórmulas (incubadoras), lo que afectó a la microbiota de los animales. De todas formas los resultados microbiológicos de todos los grupos de animales se representan en las tablas de estadísticos descriptivos.

#### ***5.1.1 Recuento de microorganismos anaerobios estrictos y facultativos en medio agar Wilkins-Chalgren***

Se observó un mayor recuento de microorganismos anaerobios estrictos y facultativos en el grupo de animales alimentado con FOS respecto al grupo control, siendo las diferencias estadísticamente significativas (**Figura 32**).

En la **tabla 17** podemos ver los datos de la mediana y los cuartiles 1 y 3 de los grupos de animales alimentados con distintas dietas. Estos datos aportan un valor representativo de los resultados obtenidos de los recuentos de microorganismos dentro de cada grupo de animales.

**Figura 32.** Recuento de microorganismos (anaerobios estrictos + facultativos) en medio de Wilkins-Chalgren para anaerobios



Media  $\pm$  EEM.  $n = 10$  en cada grupo experimental.

<sup>ab</sup> Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,05$ )

**Tabla 17.** Estadísticos descriptivos del recuento de anaerobios en medio agar Wilkins-Chalgren para anaerobios

GRUPO	Percentiles		
	25	50 (Mediana)	75
Leche materna	$1,12 \times 10^{10}$	$1,52 \times 10^{10}$	$2,54 \times 10^{10}$
Control	$2,77 \times 10^{10}$	$3,33 \times 10^{10}$	$1,18 \times 10^{11}$
Poliaminas	$5,46 \times 10^{10}$	$9,24 \times 10^{10}$	$2,44 \times 10^{11}$
FOS	$2,50 \times 10^{10}$	$4,64 \times 10^{10}$	$3,17 \times 10^{11}$

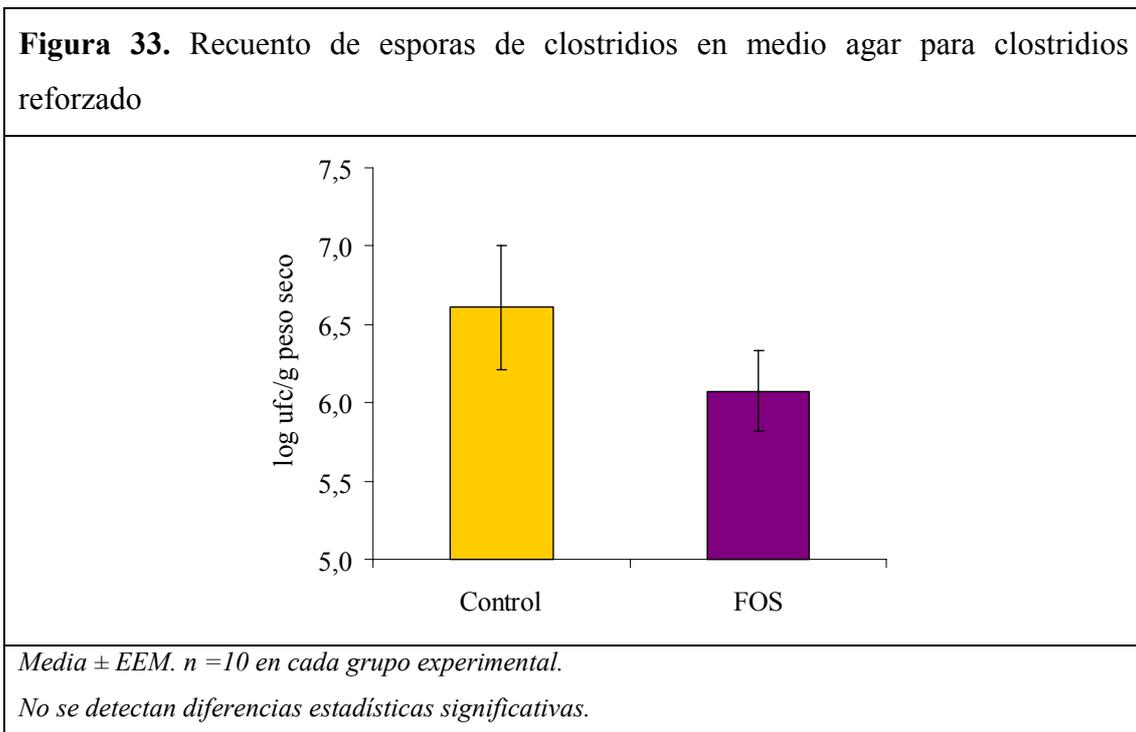
Incubación 48 horas a 37 °C.  
Unidades formadoras de colonia por gramo de peso seco de heces.

Los grupos de animales alimentados con fórmulas presentaron un mayor recuento de microorganismos anaerobios estrictos y facultativos en medio Wilkins respecto al grupo de leche materna (grupos alimentados con las fórmulas  $2,3 \times 10^{11}$  ufc/g peso seco

vs. grupo alimentado con leche materna  $1,8 \times 10^{10}$  ufc/ g peso seco), siendo las diferencias estadísticamente significativas. Esto es debido a la gran presión de patógenos de las parideras en relación a las condiciones de laboratorio donde estaban estabulados los animales alimentados con fórmulas por lo que los resultados del grupo de leche materna podrían no ser totalmente comparables en microbiología a los del resto de grupos.

### 5.1.2 Recuento de esporas de clostridios en medio agar para clostridios reforzado

Se observó un menor recuento de esporas de clostridios en el contenido cecal del grupo de animales alimentado con FOS respecto al grupo alimentado con la fórmula sin suplemento (**Figura 33**). No obstante, el análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre ambos grupos.



En la **tabla 18** se puede observar que los animales alimentados con las fórmulas presentaron una menor carga de esporas de clostridios en el contenido cecal respecto del

grupo de leche materna. Esto puede ser debido a la alta carga de esporas de clostridios que se da en las parideras respecto a las condiciones de laboratorio donde estaban estabulados los animales.

<b>Tabla 18.</b> Estadísticos descriptivos del recuento de esporas de clostridios en medio agar para clostridios reforzado			
<b>GRUPO</b>	<b>Percentiles</b>		
	<b>25</b>	<b>50 (Mediana)</b>	<b>75</b>
<b>Leche materna</b>	4,98 x 10 <sup>6</sup>	9,40 x 10 <sup>6</sup>	3,79 x 10 <sup>7</sup>
<b>Control</b>	4,19 x 10 <sup>5</sup>	1,96 x 10 <sup>6</sup>	9,40 x 10 <sup>7</sup>
<b>Poliaminas</b>	5,07 x 10 <sup>5</sup>	1,10 x 10 <sup>6</sup>	1,37 x 10 <sup>7</sup>
<b>FOS</b>	1,63 x 10 <sup>5</sup>	1,61 x 10 <sup>6</sup>	3,84 x 10 <sup>6</sup>

*Incubación 48 horas a 37 °C.*  
*Unidades formadoras de colonia por gramo de peso seco de heces.*

De los cuatro grupos de animales alimentados con las distintas dietas, el que menor recuento de esporas de clostridios presentó fue el grupo alimentado con FOS (**Tabla 18**).

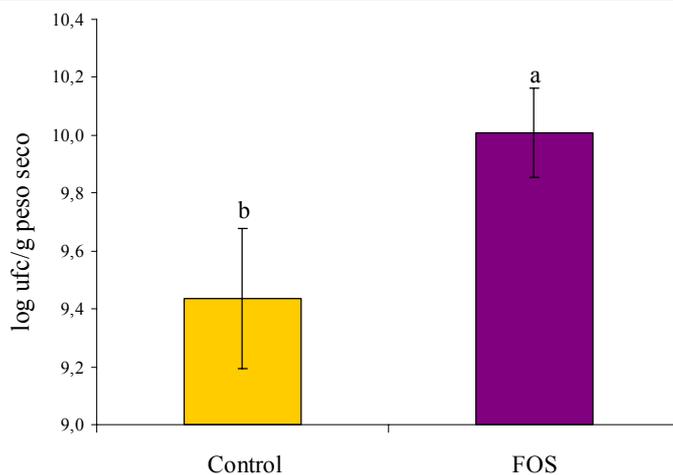
### **5.1.3 Recuento de bifidobacterias en medio Berens**

El consumo del fructooligosacárido Raftilosa P95 aumentó el recuento de bifidobacterias en el contenido cecal de estos animales, siendo las diferencias estadísticas significativas con respecto al resto de dietas (**Figura 34, Tabla 19**).

En la **tabla 19** se observa un incremento en el recuento de bifidobacterias tanto en los valores de la mediana como en los cuartiles 1 y 3 en el grupo de animales alimentado con FOS respecto al resto de grupos, incluido el grupo de animales alimentado con leche materna. La tabla muestra la mayor concentración de

bifidobacterias en cada uno de los tres percentiles en el caso de los animales alimentados con FOS.

**Figura 34.** Recuento de bifidobacterias\* en medio Berens



\*A los efectos de este trabajo, se definen bifidobacterias como aquellos microorganismos capaces de crecer en medio Berens en anaerobiosis.

Media ± EEM. n = 10 en cada grupo experimental.

<sup>a,b</sup> Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (P < 0,05).

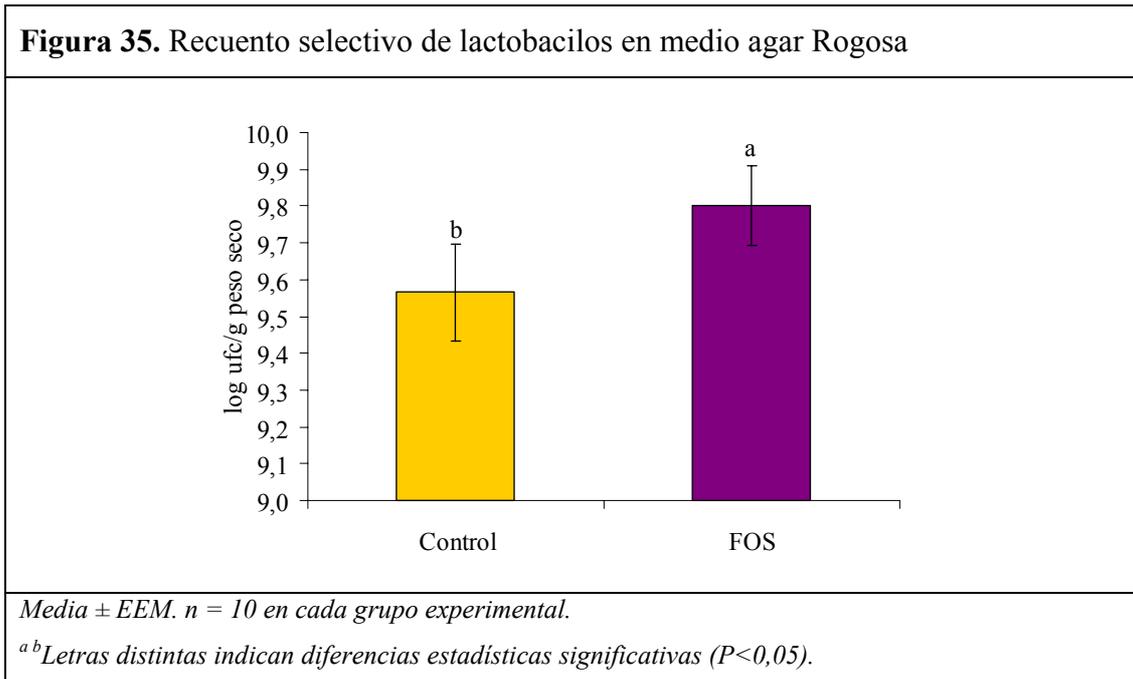
**Tabla 19.** Estadísticos descriptivos del recuento de bifidobacterias en medio Berens

GRUPO	Percentiles		
	25	50 (Mediana)	75
Leche materna	4,32 x 10 <sup>8</sup>	1,85 x 10 <sup>9</sup>	9,94 x 10 <sup>9</sup>
Control	1,29 x 10 <sup>9</sup>	2,13 x 10 <sup>9</sup>	1,14 x 10 <sup>10</sup>
Poliaminas	5,37 x 10 <sup>8</sup>	2,60 x 10 <sup>9</sup>	6,80 x 10 <sup>9</sup>
FOS	4,38 x 10 <sup>9</sup>	9,19 x 10 <sup>9</sup>	3,44 x 10 <sup>10</sup>

Incubación 48 horas a 37 °C.  
 Unidades formadoras de colonia por gramo de peso seco de heces.

### 5.1.4 Recuento selectivo de lactobacilos en medio agar Rogosa

En el recuento de lactobacilos en medio agar Rogosa observamos diferencias estadísticas significativas entre el grupo alimentado con la fórmula control y el grupo suplementado con FOS, siendo mayor el recuento en el grupo FOS (**Figura 35**).



En la **tabla 20** se puede observar que la dieta que mostró un menor recuento de lactobacilos fue la de leche materna. El recuento de lactobacilos entre el grupo de animales alimentado con leche materna y los diferentes grupos de animales alimentados con las fórmulas mostró diferencias estadísticas significativas, siendo el grupo suplementado con FOS el que presentó un mayor recuento. (Estos resultados coinciden con los datos de la bibliografía, ya que la colonización de lactobacilos en lechones está bastante disminuida por fenómenos de aumento del pH intestinal. En la actualidad este problema se intenta evitar adicionando probióticos con lactobacilos a los piensos de los animales).

**Tabla 20.** Estadísticos descriptivos del recuento de lactobacilos en medio agar Rogosa

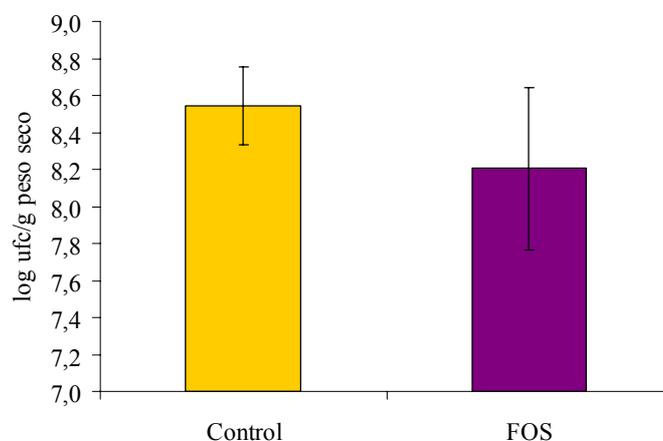
GRUPO	Percentiles		
	25	50 (Mediana)	75
<b>Leche materna</b>	4,42 x 10 <sup>8</sup>	1,10 x 10 <sup>9</sup>	3,44 x 10 <sup>9</sup>
<b>Control</b>	2,14 x 10 <sup>9</sup>	3,59 x 10 <sup>9</sup>	5,62 x 10 <sup>9</sup>
<b>Poliaminas</b>	6,67 x 10 <sup>8</sup>	2,67 x 10 <sup>9</sup>	1,91 x 10 <sup>10</sup>
<b>FOS</b>	2,98 x 10 <sup>9</sup>	6,12 x 10 <sup>9</sup>	1,15 x 10 <sup>10</sup>

*Incubación 48 horas a 37 °C.  
Unidades formadoras de colonia por gramo de peso seco de heces.*

### 5.1.5 Recuento de viables en medio MacConkey

No se apreciaron diferencias significativas en el recuento de viables entre los grupos de animales alimentados con las distintas dietas, en el medio de MacConkey. Aunque este medio no es selectivo para enterobacteriáceas en sentido estricto, los recuentos obtenidos con el mismo aportan datos valiosos para estimar las poblaciones de este grupo microbiano de bacterias anaerobias facultativas, entre las que se incluye *Escherichia coli*.

En la **tabla 21** se observa que el grupo FOS presentó un menor recuento de viables en medio MacConkey en los percentiles 25 y 50 con respecto al resto de grupos, aunque no fue igual para el percentil 75, lo que nos da una idea de la alta dispersión de datos. El grupo de animales alimentado con leche materna presentó un recuento medio de viables en medio MacConkey menor respecto a los grupos de animales alimentados con las fórmulas, siendo el grupo suplementado con FOS el que presentó un recuento medio menor de los entre los tres grupos alimentados con las fórmulas (grupo leche materna 7,3 x 10<sup>8</sup> ufc/g peso seco vs. grupo FOS 7,3 x 10<sup>9</sup> ufc/g peso seco).

**Figura 36.** Recuento de viables en medio MacConkey

Media ± EEM. n = 10 en cada grupo experimental.

No se detectan diferencias estadísticas significativas.

**Tabla 21.** Estadísticos descriptivos del recuento de viables en medio MacConkey

GRUPO	Percentiles		
	25	50 (Mediana)	75
Leche materna	$3,10 \times 10^7$	$2,46 \times 10^8$	$1,17 \times 10^9$
Control	$9,99 \times 10^7$	$2,98 \times 10^8$	$1,46 \times 10^9$
Poliaminas	$4,57 \times 10^7$	$2,95 \times 10^8$	$3,04 \times 10^9$
FOS	$1,07 \times 10^7$	$9,99 \times 10^7$	$2,83 \times 10^9$

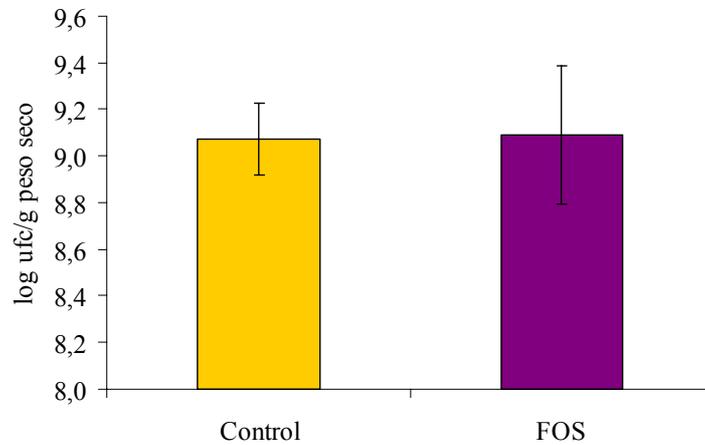
Incubación 48 horas a 37 °C.

Unidades formadoras de colonia por gramo de peso seco de heces.

### 5.1.6 Recuento de microorganismos aerobios en medio agar Columbia

En el recuento de microorganismos en medio Columbia (aerobios + anaerobios facultativos + anaerobios aerotolerantes) no se detectaron diferencias estadísticas significativas entre el grupo control y el grupo de animales alimentado con la fórmula suplementada FOS (Figura 37 y Tabla 22).

**Figura 37.** Recuento de microorganismos en medio Columbia en condiciones de aerobiosis



Media  $\pm$  EEM. n = 10 en cada grupo experimental.

No se detectan diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 22.** Estadísticos descriptivos del recuento microbiano en medio Columbia en condiciones de aerobiosis

GRUPO	Percentiles		
	25	50 (Mediana)	75
Leche materna	$2,71 \times 10^8$	$1,02 \times 10^9$	$3,77 \times 10^9$
Control	$3,64 \times 10^8$	$1,66 \times 10^9$	$2,94 \times 10^9$
Poliaminas	$3,42 \times 10^8$	$1,97 \times 10^9$	$1,99 \times 10^{10}$
FOS	$8,83 \times 10^7$	$1,22 \times 10^9$	$8,97 \times 10^9$

Incubación 48 horas a 37 °C.

Unidades formadoras de colonia por gramo de peso seco de heces.

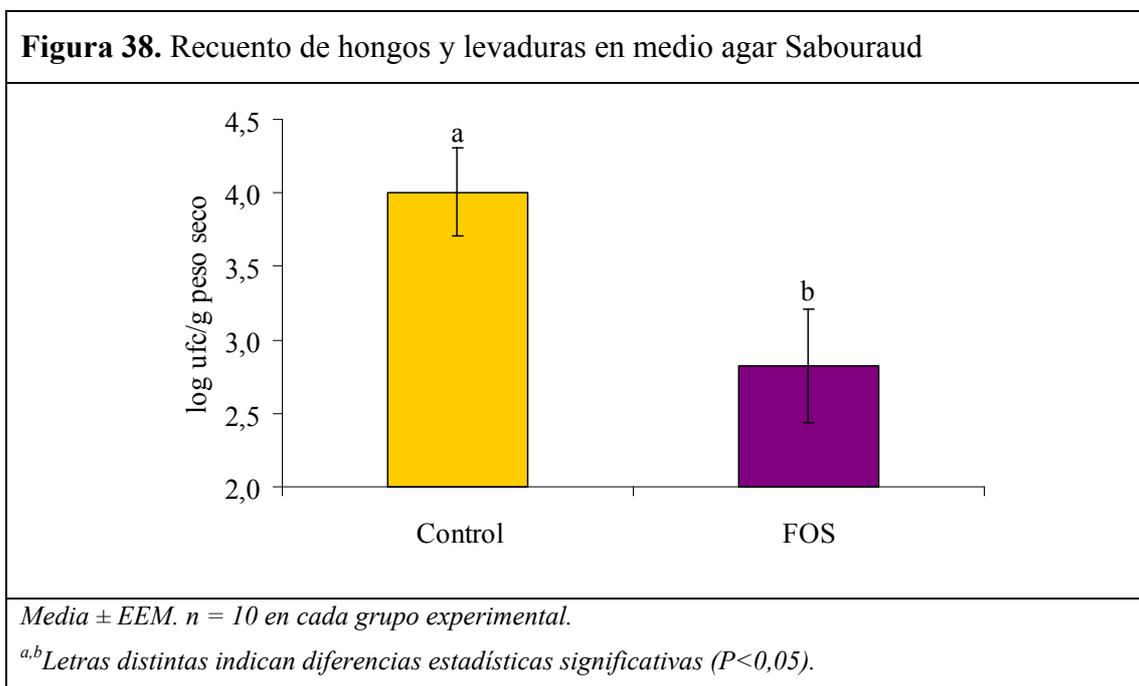
En la **tabla 22** se observa que el recuento de microorganismos en medio Columbia no se vió significativamente afectado por el tipo de dieta ingerida, no obstante los grupos de animales alimentados con leche materna y con FOS presentaron

un menor recuento en el cuartil 1 y en la mediana con respecto al grupo control y el grupo suplementado con poliaminas. En cambio, aquellos dos grupos de animales (leche materna y FOS) presentaron un mayor valor en el cuartil 3 que el grupo control.

De los cuatro grupos de animales el que presentó un recuento medio menor fue el grupo de de leche materna ( $1,8 \times 10^9$  ufc/g peso seco), siendo el grupo alimentado con FOS el que presentó el mayor recuento ( $6,5 \times 10^9$  ufc/g peso seco).

### 5.1.7 Recuento de mohos y levaduras en medio agar Sabouraud

En este caso, sí se observaron diferencias estadísticas significativas en el recuento de mohos y levaduras entre el grupo control y el grupo suplementado con FOS (**Figura 38**) siendo el grupo de animales suplementado con FOS el que presentó un menor recuento.



El recuento de mohos y levaduras se vió significativamente disminuído en los grupos de animales alimentados con FOS y con poliaminas con respecto al grupo de animales alimentado con la fórmula control (**Tabla 23**).

<b>Tabla 23.</b> Estadísticos descriptivos del recuento de microorganismos en medio agar Sabouraud cloranfenicol			
<b>GRUPO</b>	<b>Percentiles</b>		
	<b>25</b>	<b>50 (Mediana)</b>	<b>75</b>
<b>Leche materna</b>	$6,16 \times 10^2$	$3,48 \times 10^3$	$2,13 \times 10^4$
<b>Control</b>	$5,45 \times 10^3$	$9,84 \times 10^3$	$2,43 \times 10^4$
<b>Poliaminas</b>	$7,86 \times 10^2$	$2,03 \times 10^3$	$6,72 \times 10^3$
<b>FOS</b>	$1,13 \times 10^2$	$1,28 \times 10^2$	$1,23 \times 10^3$

*Incubación 48 horas a 37 °C.*  
*Unidades formadoras de colonia por gramo de peso seco de heces.*

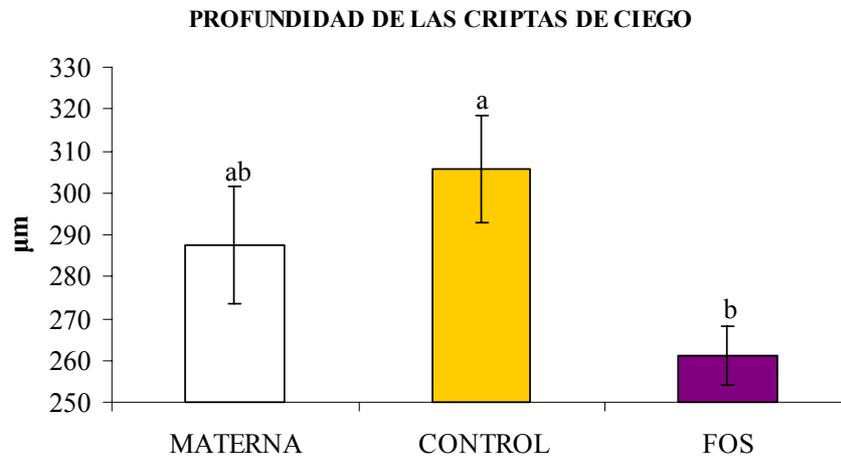
De los cuatro grupos de animales el que presentó el menor recuento de mohos y levaduras en medio Sabouraud fue el grupo alimentado con FOS, siendo las diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control y de leche materna (**Tabla 23**).

## 5.2 Histología de ciego

A nivel microscópico se realizaron cortes histológicos de ciego y se procedió a la medida de la profundidad de 20 criptas intestinales de cada sección de ciego, estimándose su valor promedio (**Figura 39**).

La profundidad de las criptas de ciego se vió afectada de forma significativa por la dieta, siendo menor en el grupo de animales alimentado con la fórmula suplementada con FOS respecto al grupo control, pero no respecto al grupo de leche materna.

**Figura 39.** Profundidad de las criptas del ciego en los grupos de animales alimentados con las distintas dietas



Media  $\pm$  EEM.  $n = 10$  en cada grupo experimental.

<sup>a,b</sup> Letras distintas significan diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,05$ )

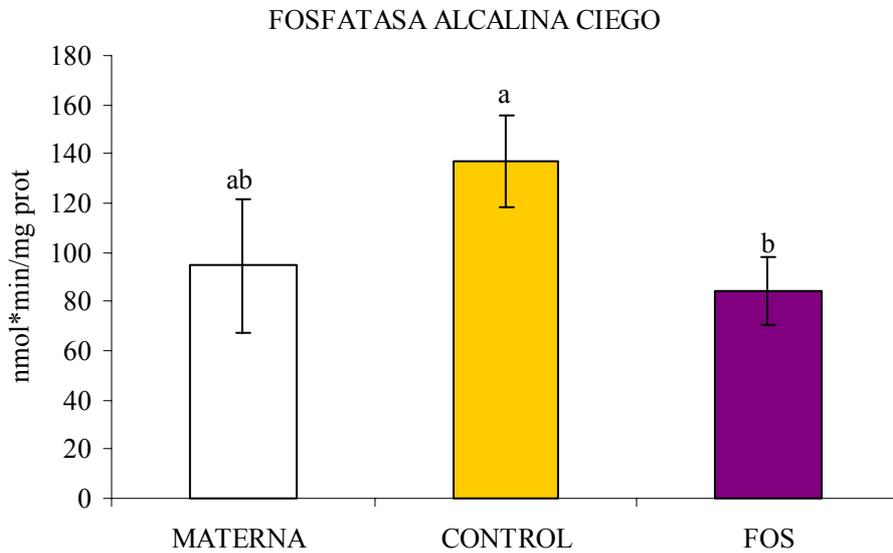
La fibra dietética es metabolizada por las bacterias del colon dando lugar a ácidos grasos de cadena corta, entre ellos el ácido butírico, que produce trofismo positivo sobre la membrana de la mucosa colónica (Hernández Rodríguez, 2001). El hecho de que en nuestros resultados no veamos este efecto podría ser debido a que la suplementación con FOS no llegó a modificar el pH del contenido cecal (**Tabla 15**) así como a la influencia que el metabolismo de las bacterias seleccionadas por los FOS ejerce a nivel de las actividades enzimáticas del tracto digestivo del hospedador.

### 5.3 Actividades enzimáticas en mucosa de ciego

A nivel enzimático se analizaron las actividades fosfatasa alcalina (**Figura 40**) y  $\gamma$ -GT de la mucosa de ciego (**Figura 41**).

La actividad de las enzimas fosfatasa alcalina y  $\gamma$ -GT en la mucosa de ciego fue menor en el grupo de animales alimentado con FOS respecto al grupo control siendo las diferencias estadísticamente significativas. No obstante, la actividad de estas enzimas no mostró diferencias estadísticas con el grupo alimentado con leche materna.

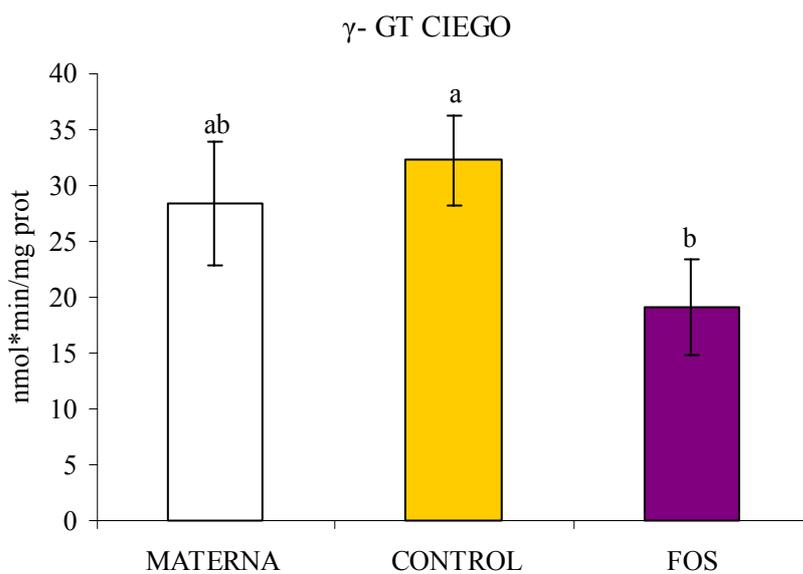
**Figura 40.** Actividad de la enzima fosfatasa alcalina en la mucosa de ciego de los grupos de animales alimentados con distintas dietas



Media  $\pm$  EEM.  $n = 10$  en cada grupo experimental.

<sup>a,b</sup>Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,05$ )

**Figura 41.** Actividad de la enzima  $\gamma$ -glutamil transferasa en la mucosa de ciego de los grupos de animales alimentados con distintas dietas

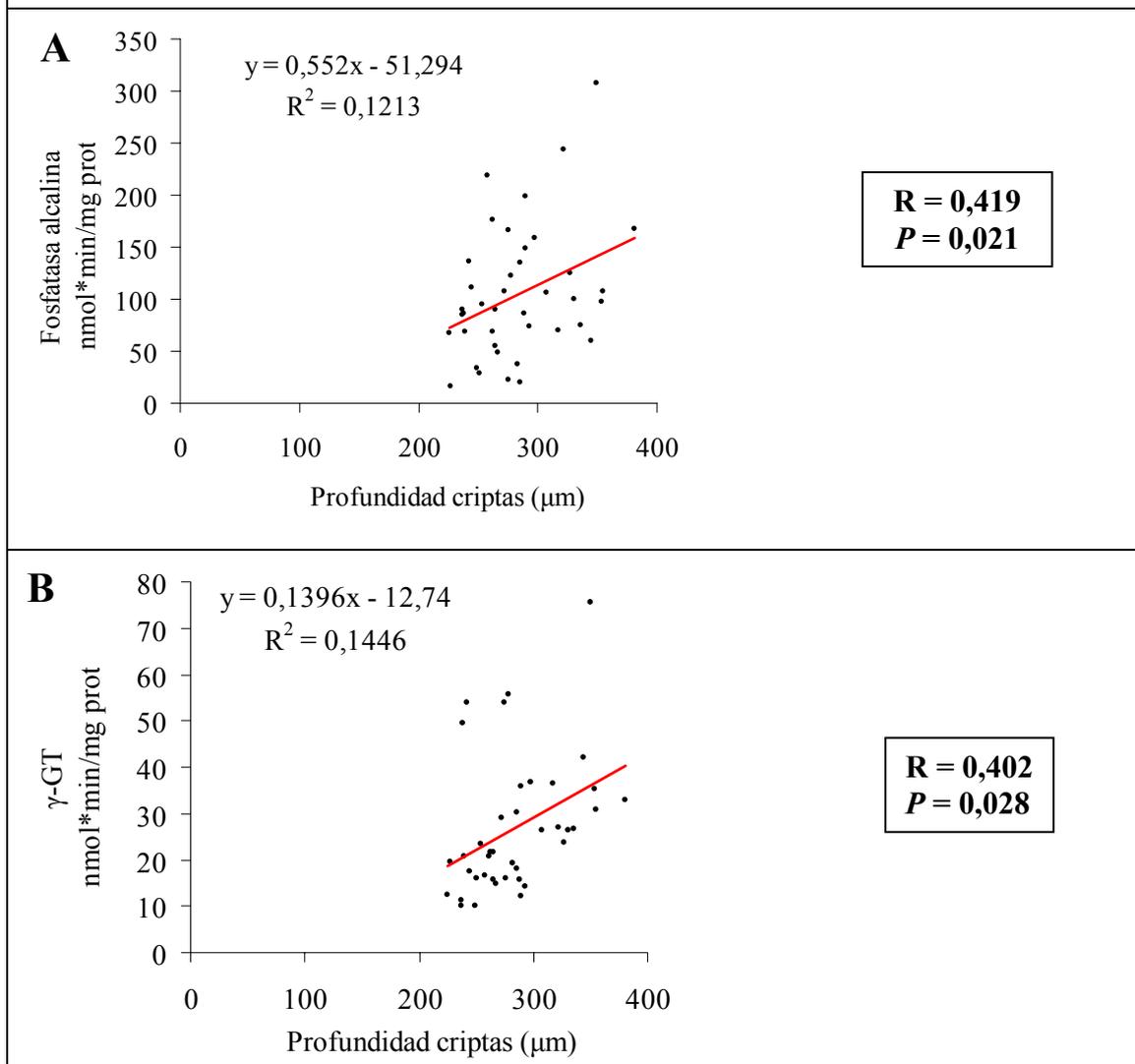


Media  $\pm$  EEM.  $n = 10$  en cada grupo experimental.

<sup>a,b</sup>Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,05$ )

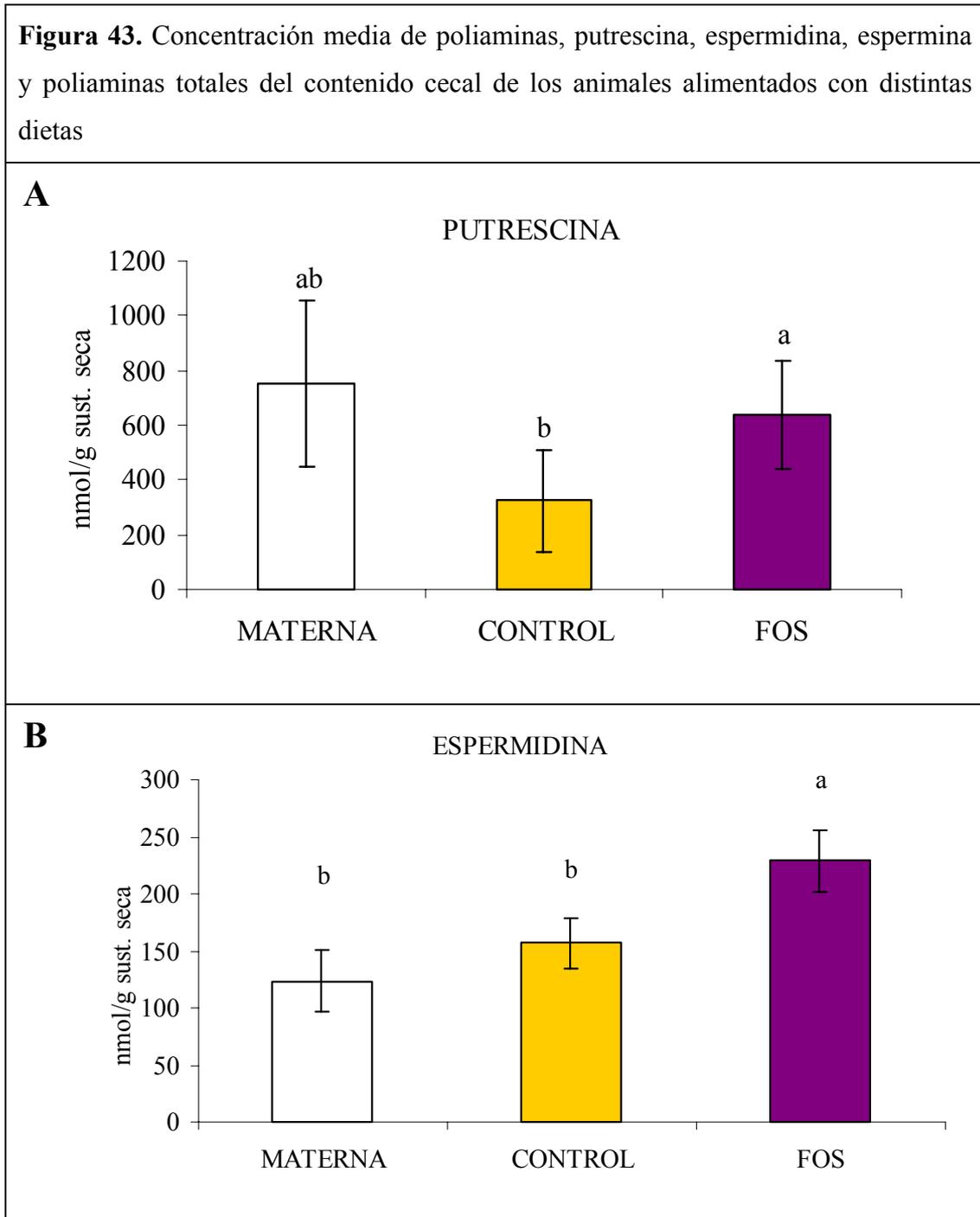
Las actividades fosfatasa alcalina y  $\gamma$ -GT de ciego mostraron cambios similares a los producidos en las medidas histológicas de ciego, de hecho estas actividades se correlacionaron positivamente con la profundidad de las criptas de ciego indicando su relación con el grado de maduración intestinal ( $R=0,419$ ,  $P=0,021$  y  $R=0,402$ ,  $P=0,028$ , respectivamente) (**Figuras 42A y 42B**). El grupo de animales alimentado con FOS presentó valores inferiores con respecto al grupo control, siendo las diferencias estadísticamente significativas, pero no con respecto al grupo alimentado con leche materna.

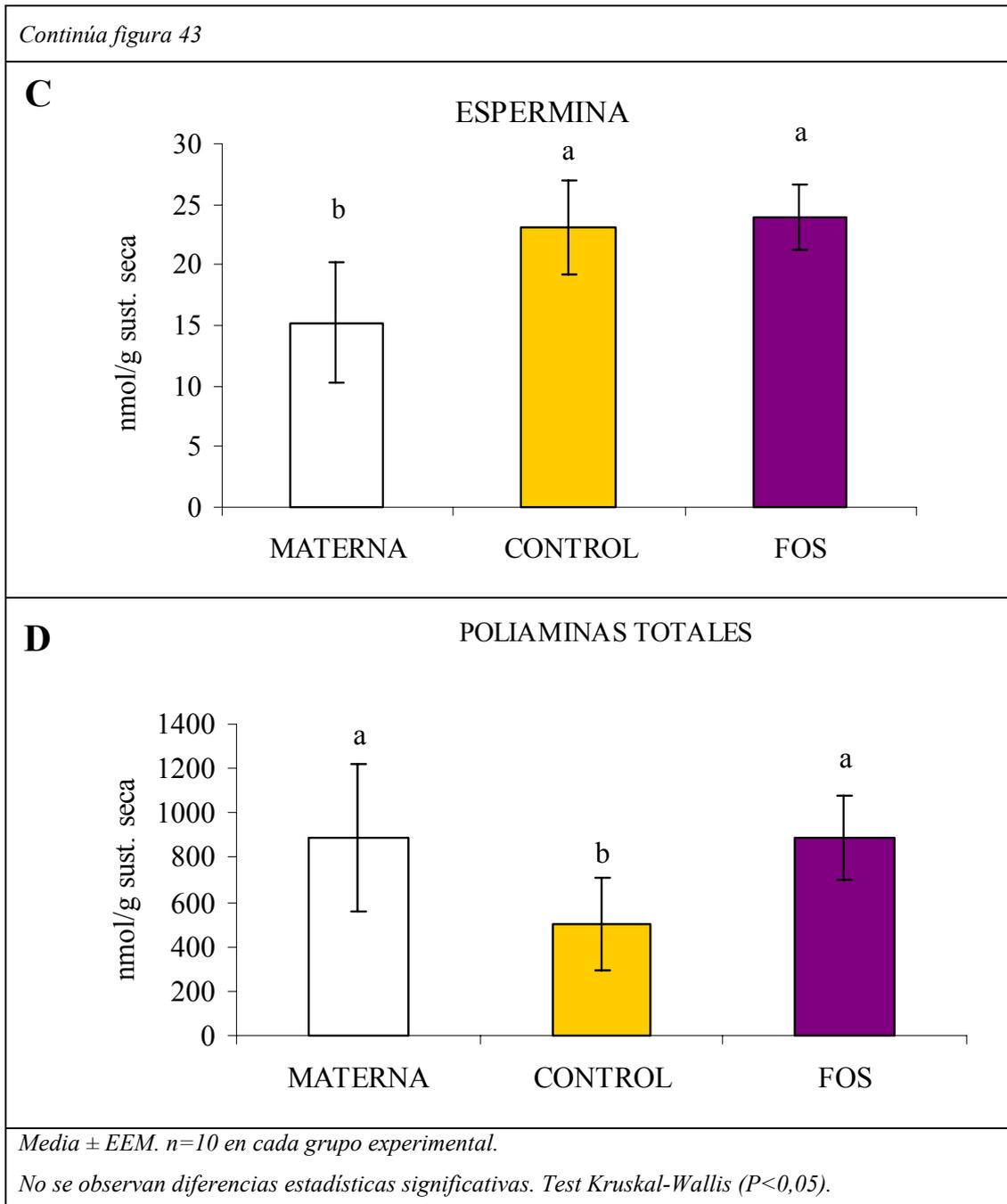
**Figura 42.** Correlaciones entre la profundidad de las criptas de ciego y la actividad fosfatasa alcalina (A) y  $\gamma$ -GT (B) de mucosa de ciego



#### 5.4 Análisis de poliaminas en ciego

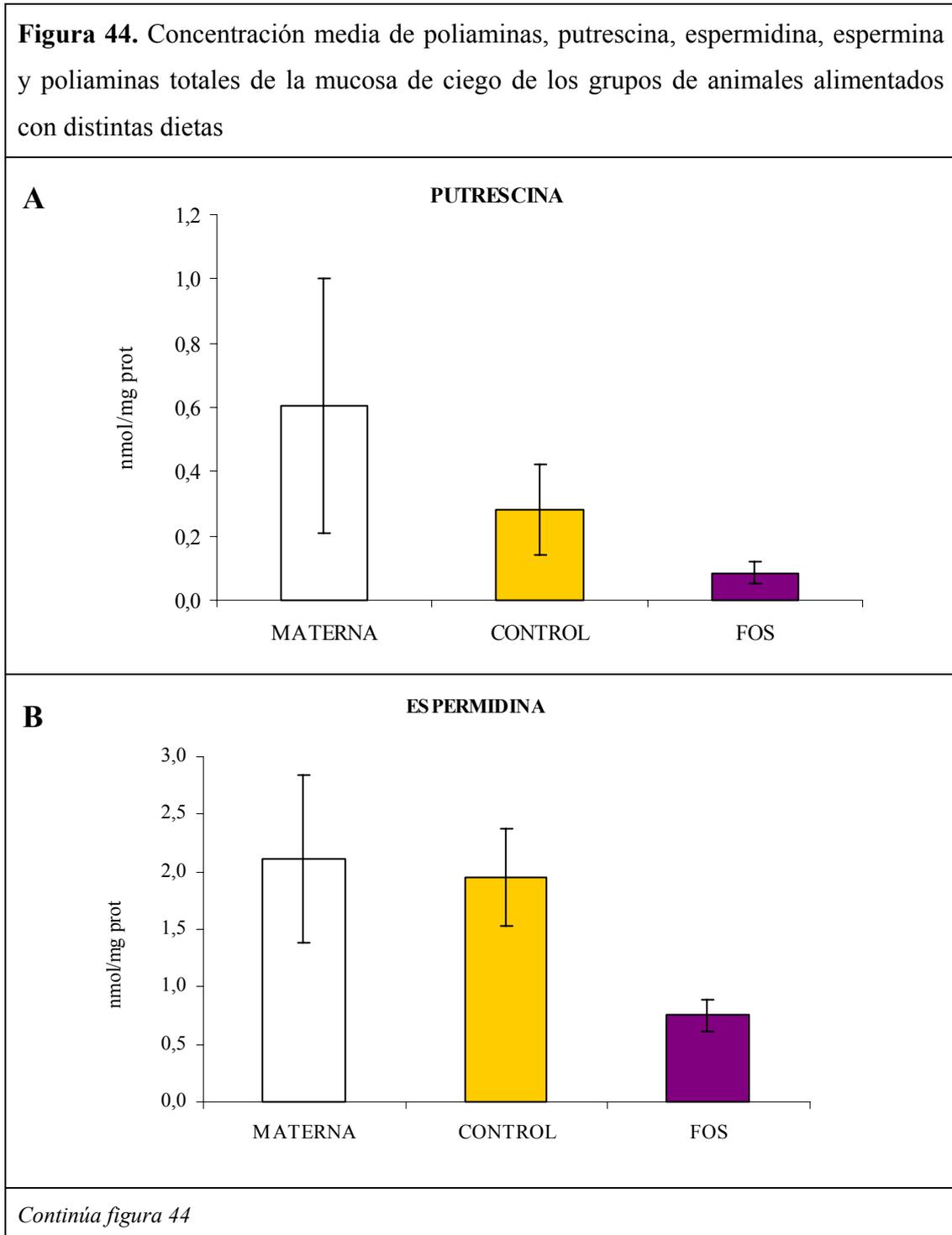
Mediante técnicas de HPLC se realizó la medida de la concentración de poliaminas, putrescina, espermidina y espermina en el contenido cecal (**Figura 43**) y en la mucosa de ciego de los animales sacrificados (**Figura 44**).

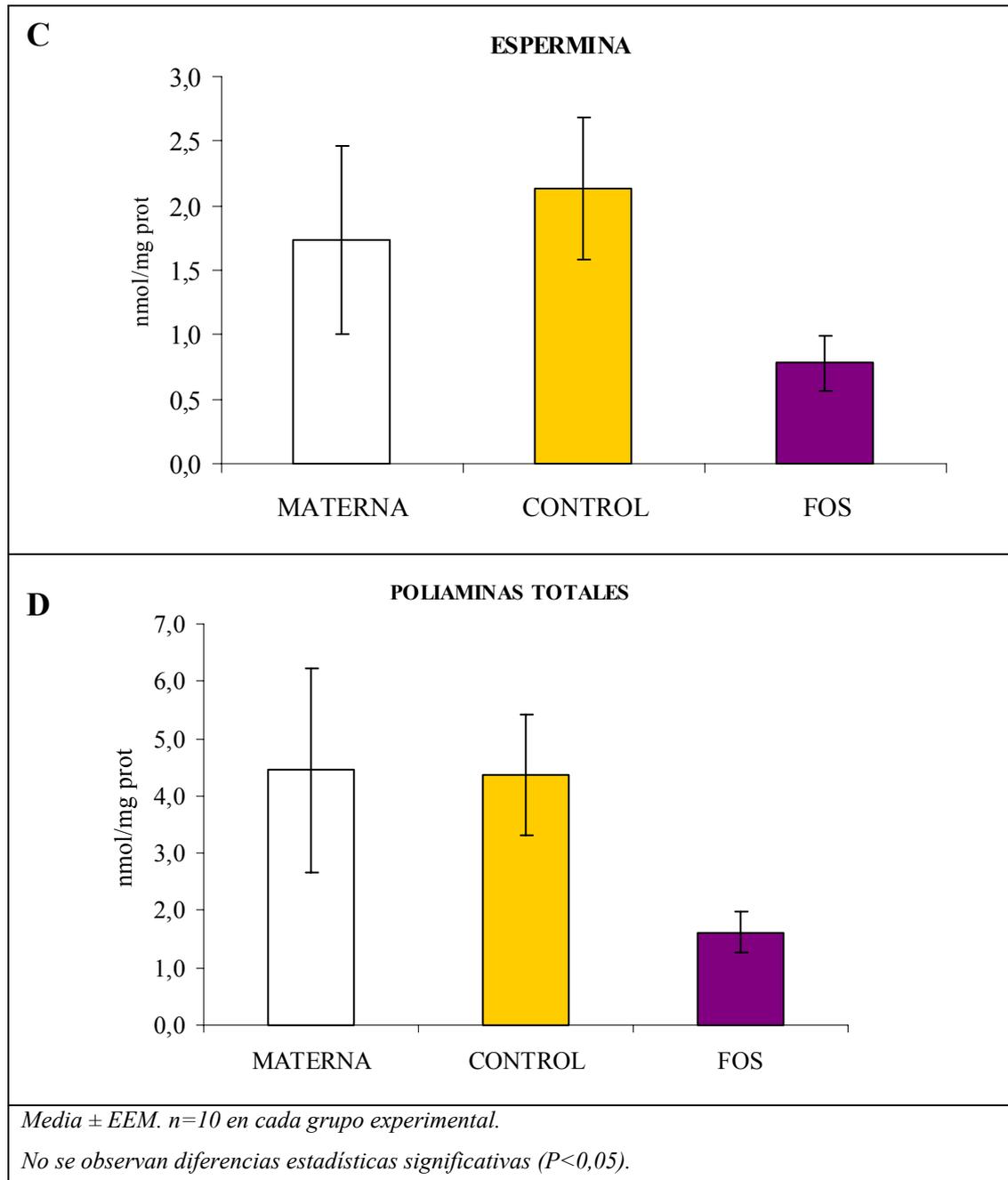




Las concentraciones de poliaminas del contenido cecal (**Figura 43**) de los cerdos a los 15 días de edad fueron significativamente mayores en los cerdos alimentados con FOS con respecto al grupo control, siendo las diferencias estadísticamente significativas para la putrescina, espermidina y poliaminas totales. La concentración total de poliaminas (**Figura 43D**) del grupo FOS fue similar a la del grupo de animales alimentado con leche materna.

Los FOS de la dieta no modificaron significativamente la concentración de poliaminas de la mucosa de ciego e incluso tendieron a disminuir las concentraciones de poliaminas si lo comparamos con el grupo control y de leche materna (**Figura 44**).





## 6. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS SELECCIONADAS POR LOS FOS

Tras el aislamiento de varias cepas bacterianas procedentes de contenido cecal de animales que habían sido alimentados con la fórmula suplementada con FOS y que muy probablemente habían sido seleccionadas por los FOS, se procedió a realizar distintas

pruebas bioquímicas para su caracterización. Para llevar a cabo las pruebas se usaron las galerías comerciales API 20A y CHL50 de la casa bioMerieux (Francia) indicadas para la identificación de bacterias anaerobias y lactobacilos respectivamente.

Los resultados obtenidos con los API 20A y CHL50 revelaron que siete cepas aisladas a partir del medio “agar Rogosa”, utilizado para el crecimiento de lactobacilos, fueron *Lactobacillus fermentum* (5 cepas) y *Lactobacillus acidophilus* (2 cepas) (**Tabla 24**). Las 3 cepas aisladas en medio “Berens” se correspondieron con *Bifidobacterium spp 1*, según las tablas de identificación del fabricante (**Tabla 25**). Los patrones bioquímicos de las cepas aisladas se detallan en las **tablas 24 y 25**.

**Tabla 24.** Resultados de las pruebas bioquímicas de los kits API CHL 50 realizadas a las distintas cepas microbianas aisladas del contenido cecal de los animales pertenecientes al género *Lactobacillus*

	<i>Lactobacillus fermentum</i> (cepa 1)	<i>Lactobacillus fermentum</i> (cepa 2)	<i>Lactobacillus fermentum</i> (cepa 3)	<i>Lactobacillus fermentum</i> (cepa 4)	<i>Lactobacillus fermentum</i> (cepa 5)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (cepa 1)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (cepa 2)
GLY	-	-	-	-	-	-	-
ERY	-	-	-	-	-	-	-
DARA	-	-	-	-	-	-	-
LARA	+	+	+	-	-	-	-
RIB	-	-	+	-	-	-	-
DXYL	-	-	-	-	-	-	-
ADO	-	-	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-	-	-
GAL	+	+	+	+	+	-	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+
FRU	-	+	-	+	+	+	+
MNE	-	+	-	-	+	+	-
SBE	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-
DUL	-	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-
MAN	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-
MDM	-	-	-	-	-	-	-
MDG	-	-	-	-	-	-	-
NAG	-	-	-	-	-	+	+
AMY	-	-	-	-	-	-	-

Continúa tabla 24

	<i>Lactobacillus fermentum</i> (cepa 1)	<i>Lactobacillus fermentum</i> (cepa 2)	<i>Lactobacillus fermentum</i> (cepa 3)	<i>Lactobacillus fermentum</i> (cepa 4)	<i>Lactobacillus fermentum</i> (cepa 5)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (cepa 1)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (cepa 2)
ARB	-	-	-	-	-	-	-
ESC	+	+	+	+	+	+	+
SAL	-	-	-	-	-	-	-
CEL	-	-	-	-	-	-	+
MAL	+	+	+	-	-	+	+
LAC	+	+	+	+	+	-	+
MEL	+	+	+	+	+	-	+
SAC	+	+	+	+	-	+	+
TRE	-	-	-	-	-	-	+
INU	-	-	-	-	-	-	-
MLZ	-	-	-	-	-	-	-
RAF	+	+	+	+	+	+	+
AMD	-	-	-	-	-	+	+
GLYG	-	-	-	-	-	-	-
XLT	-	-	-	-	-	-	-
GEN	-	-	-	-	-	-	+
TUR	-	-	-	-	-	-	-
LYX	-	-	-	-	-	-	-
TAG	-	-	-	-	-	-	+
DFUC	-	-	-	-	-	-	-
LFUC	-	-	-	-	-	-	-
DARL	-	-	-	-	-	-	-
LARL	-	-	-	-	-	-	-
GNT	+	+	+	-	-	-	-
2KG	-	-	-	-	-	-	-
5KG	-	-	-	-	-	-	-

GLY, glicerol; ERY, eritritol; DARA, D-arabinosa; LARA, L-arabinosa; RIB, ribosa; DXYL, D-xilosa; LXYL, L-xilosa; ADO, adonitol; MDX,  $\beta$ -metil-D-xilosido; GAL, galactosa; GLU, glucosa; FRU, fructosa; MNE, manosa; SBE, sorbosa; RHA, rhamnosa; DUL, dulcitol; INO, inositol; MAN, manitol; SOR, sorbitol; MDM,  $\alpha$ -metil-D-manosido; MDG, ,  $\alpha$ -metil-D-glocosido; NAG, N-acetil-glucosamina; AMY, amigdalina; ARB, arbutina; ESC, esculina; SAL, salicina; CEL, celobiosa; MAL, maltosa; LAC, lactosa; MEL, melibiosa; SAC, sacarosa; TRE, trehalosa; INU, inulina; MLZ, melecitosa; RAF, rafinosa; AMD, almidón; GLY, glicógeno; XLT, xilitol; GEN, gentiobiosa; DTUR, D-turanosa; DLYX, D-lixosa; DTAG, D-tagatosa; DFUC, D-fucosa; LFUC, L-fucosa; DARL, D-arabitol; LARL, L-arabitol; GNT, gluconato; 2KG, 2-keto-gluconato; 5KG, 5-keto-gluconato

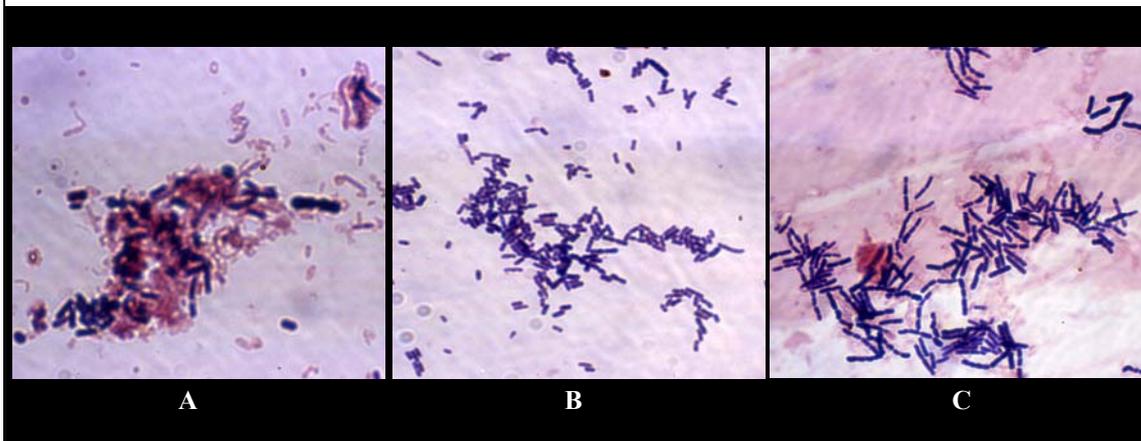
**Tabla 25.** Resultados de las pruebas bioquímicas de los kits API 20 A realizadas a las distintas cepas microbianas aisladas del contenido cecal de los animales pertenecientes a l género *Bifidobacterium*

	<i>Bifidobacterium spp</i> (cepa 1)	<i>Bifidobacterium spp</i> (cepa 2)	<i>Bifidobacterium spp</i> (cepa 3)
IND	-	-	-
URE	-	-	-
GLU	+	+	+
MAN	-	-	+
LAC	+	+	+
SAC	+	+	+
MAL	+	+	+
SAL	+	+	-
XYL	+	+	-
ARA	+	+	-
GEL	-	-	-
ESC	+	+	-
GLY	-	-	-
CEL	-	-	-
MNE	-	-	+
MLZ	-	-	-
RAF	+	+	+
SOR	-	-	+
RHA	-	-	+
TRE	-	-	-
CAT	-	-	-
SPOR	-	-	-
GRAM	+	+	+
COCC	-	-	-

*IND*, formación de indol; *URE*, ureasa; *GLU*, acidificación (glucosa); *MAN*, acidificación (manitol); *LAC*, acidificación (lactosa); *SAC*, acidificación (sacarosa); *MAL*, acidificación (maltosa); *SAL*, acidificación (salicina); *XYL*, acidificación (xilosa); *ARA*, acidificación (arabinosa); *GEL*, hidrólisis (proteasa) (gelatina); *ESC*, hidrólisis (proteasa) (esculina); *GLY*, acidificación (glicerol); *CEL*, acidificación (celobiosa); *MNE*, acidificación (manosa); *MLZ*, acidificación (melecitosa); *RAF*, acidificación (rafinosa); *SOR*, acidificación (sorbitol); *RHA*, acidificación (rhamnosa); *TRE*, acidificación (trehalosa); *CAT*, catalasa; *SPOR*, esporas; *GRAM*, coloración de Gram; *COCC*, morfología.

La **figura 45** muestra morfologías microbianas del contenido cecal de los animales (A) y de dos cepas purificadas, de entre las diez aisladas (B y C).

**Figura 45.** Tinción de Gram de la comunidad de bacterias del contenido cecal (A), de cepas aisladas en medio Berens (B), y cepas aisladas en medio Rogosa (C).



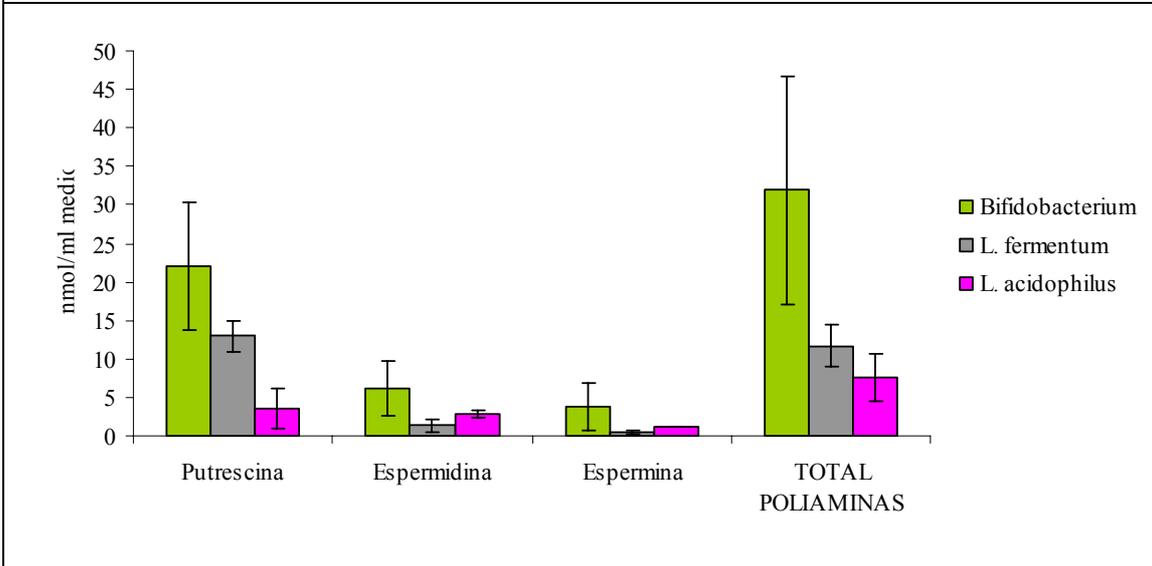
## 7. PRODUCCIÓN DE POLIAMINAS POR LAS CEPAS BACTERIANAS SELECCIONADAS POR LOS FOS

Para comprobar que la síntesis de poliaminas en el contenido cecal de los animales alimentados con FOS podía ser debida a las cepas microbianas que ellos habían seleccionado, se procedió, tras la identificación de las distintas cepas, a estudiar su capacidad de producción de poliaminas.

Las cepas incluídas en este estudio fueron tres de *Bifidobacterium sp*, cinco de *Lactobacillus fermentum* y dos de *Lactobacillus acidophilus*. Para ello inicialmente se sembraron las distintas cepas en los medios selectivos líquidos (Rogosa y Berens) en los cuales habían sido aisladas en un principio. A partir de estos cultivos, se tomaron inóculos para sembrar con ellos el medio Falkow suplementado con los aminoácidos arginina, lisina y ornitina (0,5% w/v) en el que se estudió la producción de poliaminas.

Cuando estas cepas fueron cultivadas en medio Falkow con y sin aminoácidos la producción de poliaminas por las mismas se vio significativamente afectada. En la **figura 46** podemos observar que cuando el medio Falkow fue suplementado con el aminoácido ornitina las cepas aisladas produjeron cantidades mayores de poliaminas respecto al medio Falkow sin suplementar, siendo las cepas de *Bifidobacterium sp*. las que mostraron un mayor incremento (**Figura 46**).

**Figura 46.** Incremento en la producción de poliaminas de las cepas bacterianas seleccionadas por los FOS incubadas en medio Falkow suplementado con ornitina (0,5% w/v) respecto al medio Falkow sin suplementar\*



Media  $\pm$  EEM.

\*Los valores del eje de ordenadas corresponden a la diferencia entre el nivel de poliaminas producido en medio Falkow y medio Falkow suplementado con ornitina (0,5 / w/v) (Ver tabla 26).

No se detectan diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,05$ ).

La producción total de poliaminas por parte de todas las cepas fue significativamente mayor en medio Falkow suplementado con el aminoácido ornitina que en el resto de medios (**Tabla 26**).

Las cepas de *Bifidobacterium* fueron las que presentaron un mayor incremento en la producción de poliaminas totales en medio Falkow suplementado con ornitina respecto al medio Falkow sin suplementar. En el medio Falkow con ornitina la producción de putrescina por las cepas de *Bifidobacterium* sp. y *Lactobacillus acidophilus* fue significativamente mayor que la de *Lactobacillus fermentum*. Además, las poliaminas espermina y espermidina fueron producidas en mayor cantidad por *Bifidobacterium* sp. que por *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus fermentum* (**Tabla 26**).

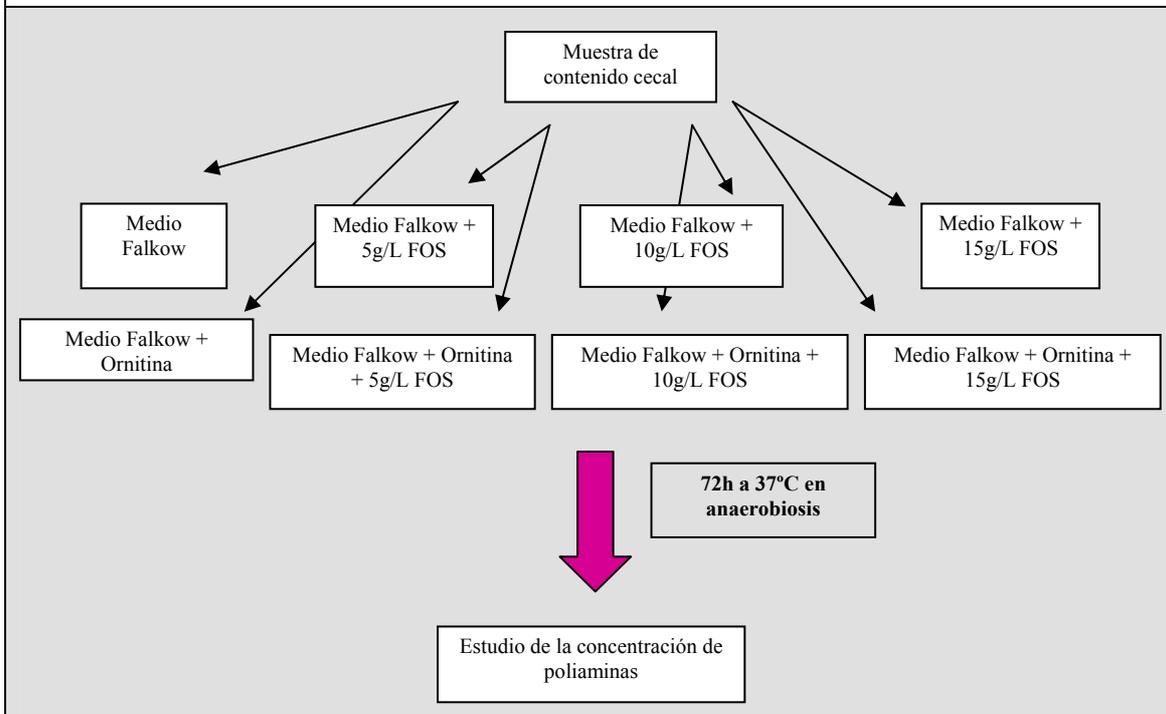
**Tabla 26.** Concentraciones de poliaminas producidas por las distintas cepas bacterianas aisladas de la microbiota cecal cultivadas en medio Falkow suplementado con diferentes aminoácidos (0,5% w/v).

<i>Medios de cultivo</i>	<i>Poliaminas (nmol/ml medio de cultivo)</i>			
	<i>Putrescina</i>	<i>Espermidina</i>	<i>Espermina</i>	<i>Poliaminas totales</i>
<b><i>Bifidobacterium sp</i> (n=3)</b>				
<b>Falkow</b>	3,83±0,74 <sup>b</sup>	2,47±0,32 <sup>a</sup>	1,89±0,05 <sup>ab</sup>	8,19±0,84 <sup>b</sup>
<b>Falkow+Arg</b>	6,30±4,32 <sup>b</sup>	1,15±1,15 <sup>b</sup>	0,95±0,83 <sup>b</sup>	8,40±6,30 <sup>b</sup>
<b>Falkow+Lys</b>	3,48±0,53 <sup>b</sup>	3,09±0,28 <sup>ab</sup>	2,15±0,20 <sup>ab</sup>	8,71±0,82 <sup>b</sup>
<b>Falkow+Orn</b>	25,86±8,89 <sup>a</sup>	8,62±3,75 <sup>a</sup>	5,66±3,09 <sup>a</sup>	40,14±15,67 <sup>a</sup>
<b><i>Lactobacillus fermentum</i> (n=5)</b>				
<b>Falkow</b>	4,40±0,51 <sup>b</sup>	1,86±0,47 <sup>a</sup>	1,35±0,31 <sup>abc</sup>	7,61±1,04 <sup>b</sup>
<b>Falkow+Arg</b>	2,95±0,42 <sup>b</sup>	0,45±0,45 <sup>b</sup>	0,12±0,00 <sup>b</sup>	3,52±0,83 <sup>b</sup>
<b>Falkow+Lys</b>	5,75±2,03 <sup>b</sup>	2,02±0,77 <sup>abc</sup>	1,64±0,44 <sup>abc</sup>	9,41±2,22 <sup>b</sup>
<b>Falkow+Orn</b>	12,72±1,85 <sup>c</sup>	4,33±0,49 <sup>c</sup>	2,15±0,29 <sup>c</sup>	19,20±1,84 <sup>c</sup>
<b><i>Lactobacillus acidophilus</i> (n=2)</b>				
<b>Falkow</b>	7,52±1,14 <sup>b</sup>	9,94±4,51 <sup>d</sup>	2,29±0,09 <sup>abc</sup>	19,75±5,57 <sup>b</sup>
<b>Falkow+Arg</b>	2,58±0,90 <sup>b</sup>	0,36±0,36 <sup>b</sup>	0,12±0,00 <sup>b</sup>	3,06±1,26 <sup>b</sup>
<b>Falkow+Lys</b>	5,75±0,14 <sup>b</sup>	1,86±0,59 <sup>abcd</sup>	2,36±0,69 <sup>abc</sup>	9,97±0,04 <sup>b</sup>
<b>Falkow+Orn</b>	22,66±3,92 <sup>a</sup>	3,23±2,72 <sup>c</sup>	1,64±0,86 <sup>c</sup>	27,52±0,36 <sup>ac</sup>
<p><i>Media ± EEM. Las dos fuentes de variación (medios x cepas bacterianas) fueron analizadas con un ANOVA de doble vía con un posterior test de Bonferroni.</i></p> <p><sup>ab</sup>Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (<math>P &lt; 0,05</math>)</p>				

## 8. ESTUDIO DOSIS-DEPENDIENTE ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE FOS Y LA PRODUCCIÓN DE POLIAMINAS BACTERIANAS

Para estudiar la posible existencia de una relación dosis-dependiente entre la producción de poliaminas bacterianas por el conjunto de la comunidad bacteriana del ciego a causa de la adición de FOS, el contenido cecal de los cerdos del grupo control y del grupo de animales suplementado con FOS se inoculó en distintos tubos con medio Falkow y medio Falkow suplementado con el aminoácido ornitina (precursor de la putrescina) con un suplemento adicional de FOS (Raftilosa P95) a distintas concentraciones 0, 5, 10 y 15 g/L. Las concentraciones de poliaminas fueron analizadas tras un periodo de incubación de 72 h a 37°C. el esquema d trabajo se muestra en la **figura 47**.

**Figura 47.** Modelo experimental del estudio dosis-dependiente de la producción de poliaminas por parte de las bacterias del contenido cecal de los cerdos, en función de la concentración de FOS presente en medio Falkow y medio Falkow suplementado con el aminoácido ornitina



**Tabla 27.** Concentración de poliaminas producidas por microorganismos del contenido cecal de los cerdos alimentados con la formula control y la formula suplementada con FOS, cultivados en medio Falkow y medio Falkow suplementado con ornitina (0,5% w/v).

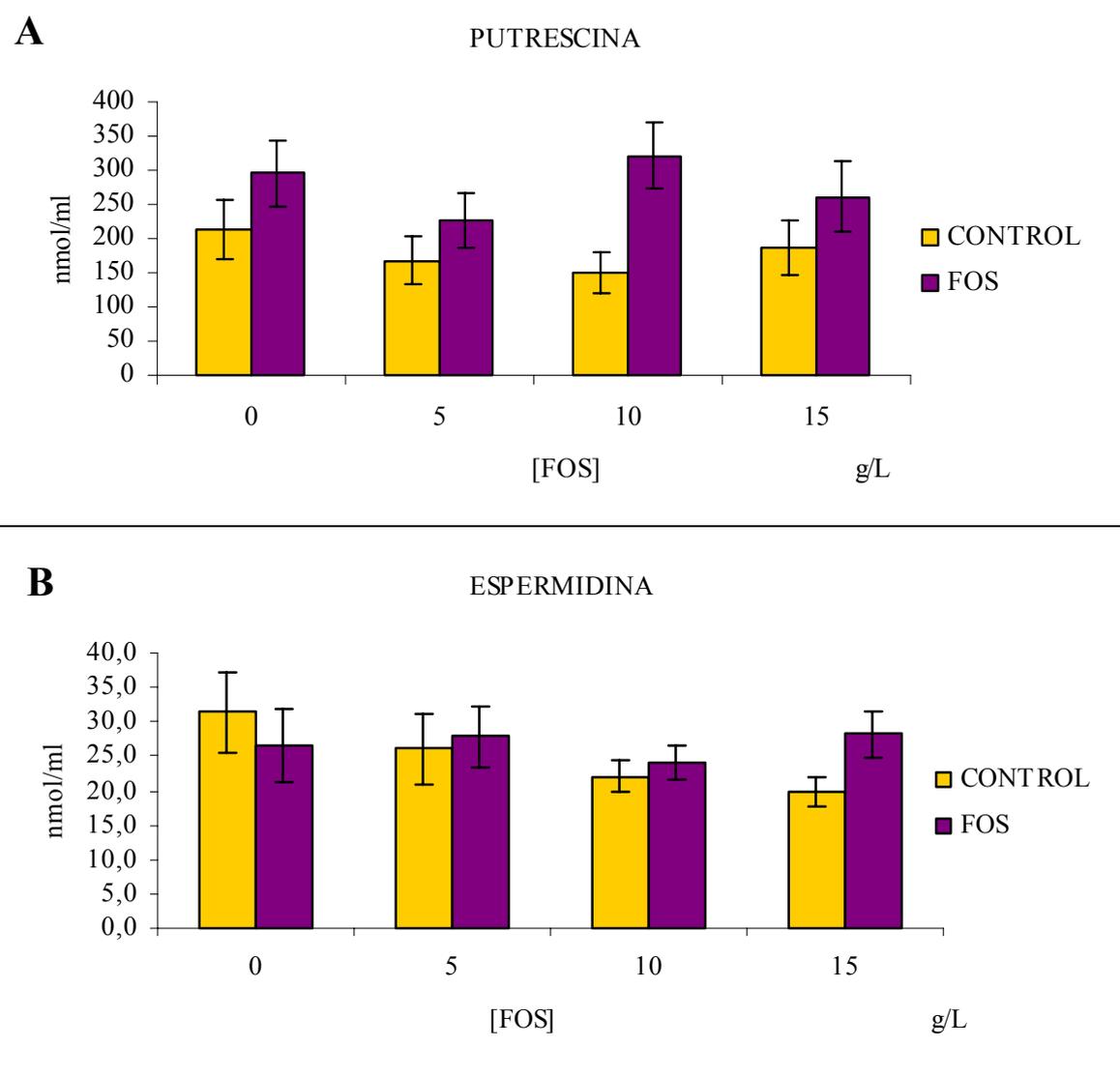
	Putrescina (nmol/ml)	Espermidina (nmol/ml)	Espermina (nmol/ml)	Poliaminas totales (nmol/ml)
<b>CONTROL</b> (n=10)				
Falkow	212,2±43,7 <sup>a</sup>	31,3±5,9 <sup>a</sup>	10,2±1,8 <sup>a</sup>	253,8±43,7 <sup>a</sup>
Falkow+Orn	3581,1±858,2 <sup>b</sup>	32,3±3,5 <sup>a</sup>	13,9±1,6 <sup>a</sup>	3627,4±859,3 <sup>b</sup>
<b>FOS</b> (n=9)				
Falkow	295,6±47,7 <sup>a</sup>	26,7±5,3 <sup>a</sup>	8,4±1,4 <sup>a</sup>	330,7±45,8 <sup>a</sup>
Falkow+Orn	4771,9±887,4 <sup>b</sup>	32,7±7,2 <sup>a</sup>	12,0±4,2 <sup>a</sup>	4816,6±884,8 <sup>b</sup>
<i>Media ± EEM. Valores de la misma columna que no comparten la misma letra significa diferencias estadísticas significativas (P&lt;0,05)</i>				

Las concentraciones de poliaminas producidas por los microorganismos del contenido cecal cultivado en medio Falkow y medio Falkow suplementado con ornitina no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los animales del grupo control y el grupo FOS (**Tabla 27**). No obstante, las concentraciones de poliaminas fueron significativamente mayores en el medio suplementado con ornitina para los dos grupos de animales (FOS y control). La poliamina predominante fue putrescina, esto se podría explicar porque la ornitina es el precursor directo de la putrescina, por acción de la enzima ornitina-descarboxilasa. Estos resultados fueron inesperados porque en el contenido cecal de los animales alimentados con FOS la concentración de poliaminas fue mayor que en los animales del grupo control (69,13±14,94 nmol/ml vs. 41,55±16,89 nmol/ml).

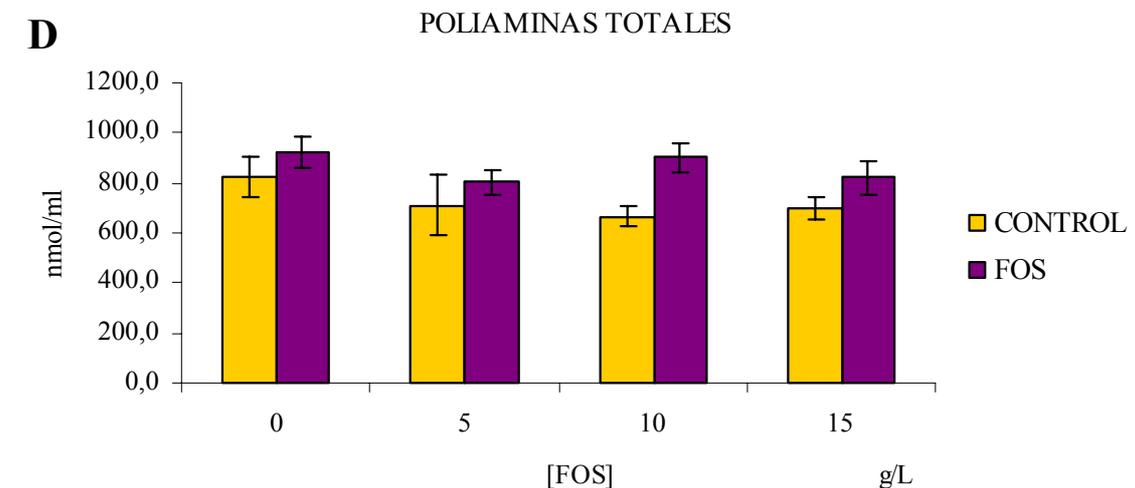
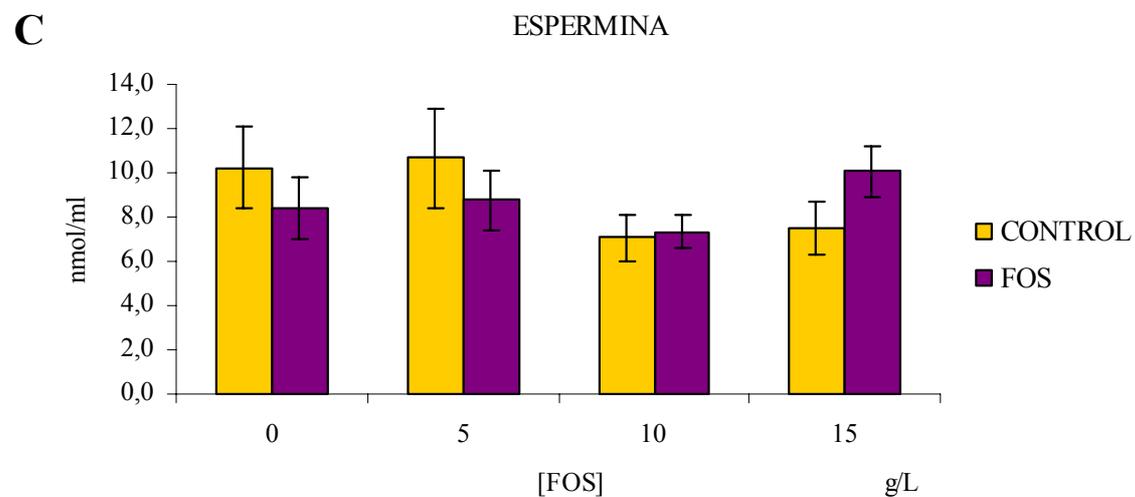
Las concentraciones de poliaminas bacterianas del contenido cecal cultivado en medio Falkow no mostraron diferencias significativas entre los animales alimentados con las distintas dietas, no obstante, las concentraciones de putrescina y poliaminas totales tendieron a ser mayores en el grupo de animales alimentados con FOS con

respecto al grupo control, independientemente de la concentración de FOS añadida al medio (**Figura 48**). La producción de poliaminas en medio Falkow por parte de las bacterias del contenido cecal de los cerdos no mostró una relación dosis dependiente en respuesta a la adición de FOS al medio.

**Figura 48.** Concentración de poliaminas, putrescina, espermidina, espermina y poliaminas totales producidas por los microorganismos del contenido cecal de los cerdos alimentados con la formula control y con la fórmula suplementada con FOS cultivados en medio Falkow suplementado con diferentes concentraciones de FOS (0, 5, 10 y 15 g/L)



Continúa figura 48

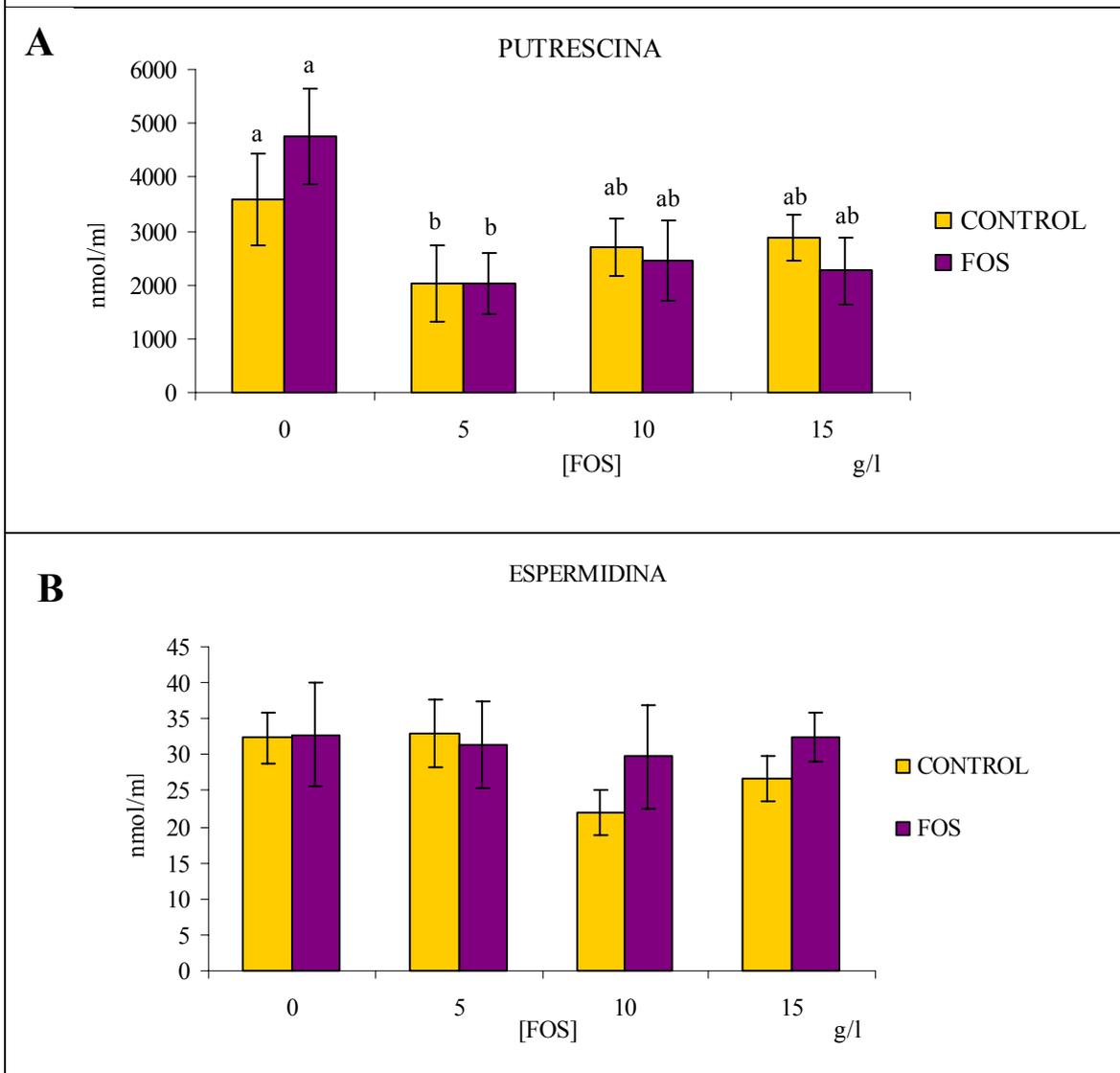


Media  $\pm$  EEM. (n=9). ANOVA de doble vía con un posterior test de Bonferroni (grupo de animales  $\times$  concentración de FOS). Diferencias significativas  $P < 0,05$ .

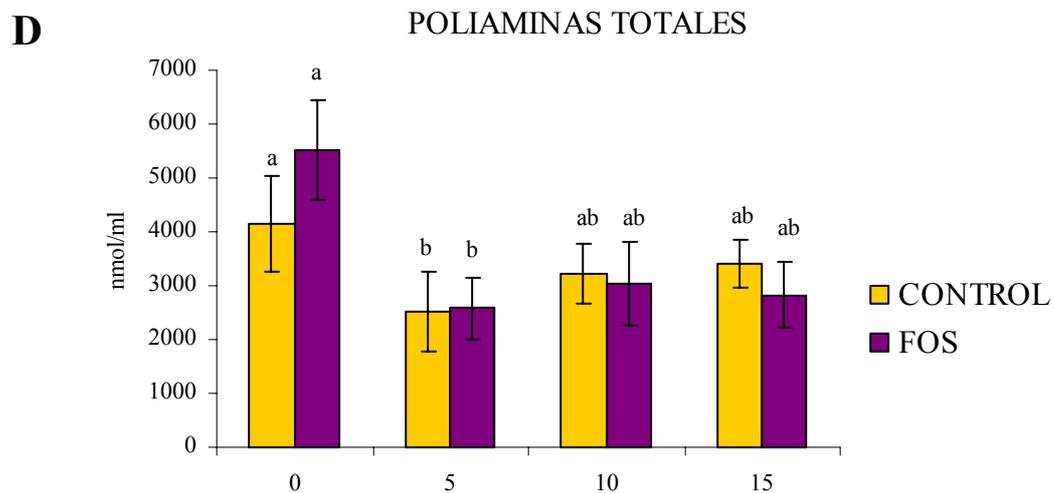
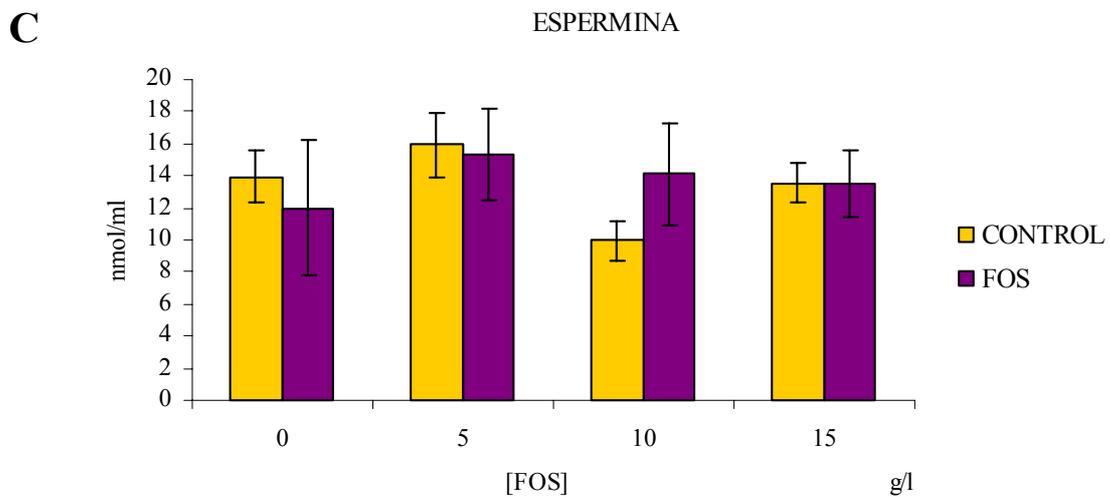
Al igual que ocurrió en el medio Falkow sin suplementar con ornitina, las concentraciones de poliaminas bacterianas del contenido cecal cultivado en el medio Falkow suplementado con ornitina, no mostraron diferencias significativas entre los animales alimentados con las distintas dietas aunque hubo una tendencia mayor en el medio inoculado con el contenido cecal de los cerdos alimentados con FOS respecto al de los cerdos controles (**Figura 49**). Los resultados no mostraron una relación dosis-dependiente entre la adición de FOS al medio y la producción de poliaminas bacterianas

por la microbiota del grupo control y FOS en medio Falkow suplementado con ornitina. Las concentraciones de putrescina y poliaminas totales fueron significativamente más bajas en el medio suplementado con 5 g/L de FOS que en los medios suplementados con 10 y 15 g/L de FOS, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

**Figura 49.** Concentración de poliaminas, putrescina, espermidina, espermina y poliaminas totales producidas por los microorganismos del contenido cecal de los cerdos alimentados con la fórmula control y con la fórmula suplementada con FOS cultivados en medio Falkow suplementado con ornitina (0,5% w/v) y diferentes concentraciones de FOS (0, 5, 10 y 15 g/L)



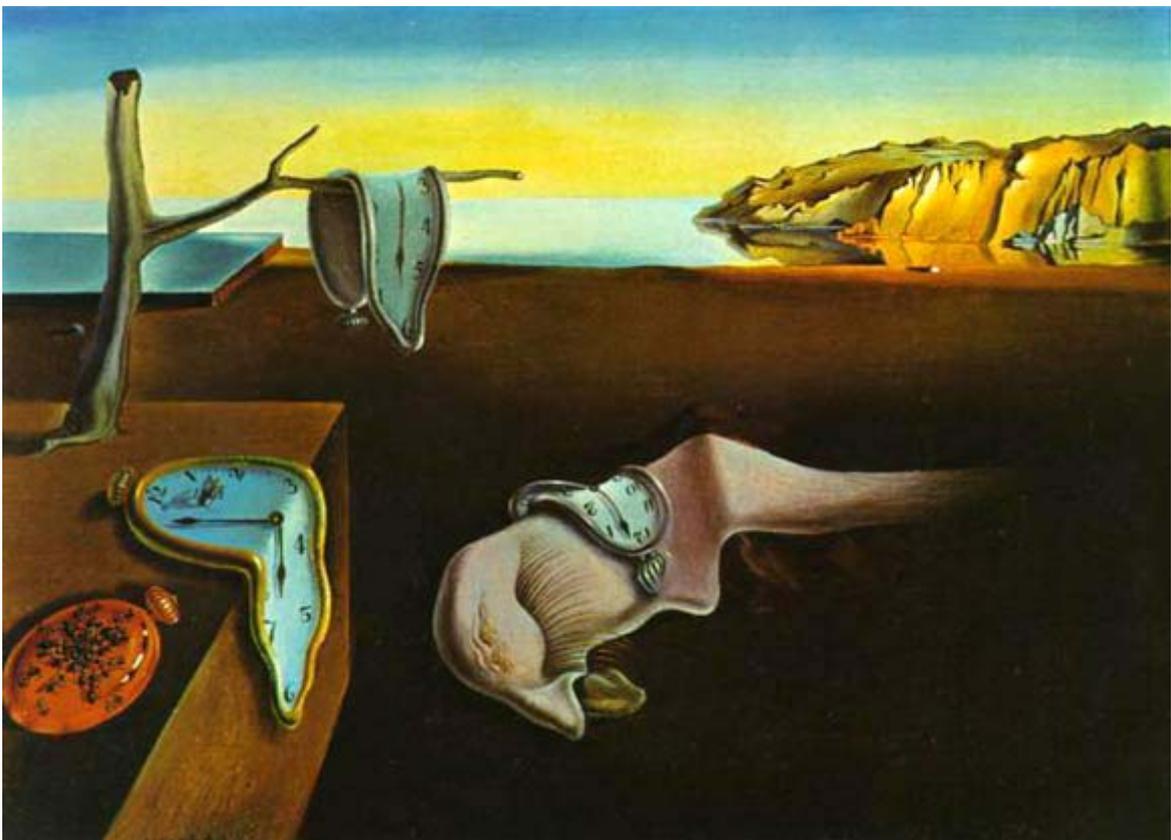
Continúa figura 49



Media  $\pm$  EEM. (n=9). ANOVA de doble vía con un posterior test de Bonferroni (grupo de animales  $\times$  concentración de FOS). Diferencias significativas  $P < 0,05$ .



## *V. Discusión*



*La persistencia de la memoria, Dalí 1931*



## V. DISCUSIÓN

Para un completo entendimiento del desarrollo y función intestinal del neonato se requiere el conocimiento de la composición y propiedades de la leche materna y el metabolismo en el recién nacido. Este trabajo utiliza el cerdo como modelo de experimentación animal en el periodo neonatal, ya que el cerdo es un modelo válido para el estudio de los efectos que la dieta ejerce sobre la composición y fisiología tisular durante el período postnatal temprano (Shulman *et al.*, 1988). La etapa de desarrollo en la que se encuentran al nacer es bastante similar a la del hombre, aunque su tasa de crecimiento es mucho mayor (Widdowson, 1985), esto permite ensayar en un modelo animal los nuevos ingredientes a adicionar a las fórmulas infantiles. Además, con la alta tasa de supervivencia actual de niños prematuros, la función del intestino inmaduro y su capacidad para hacer frente a la alimentación enteral prematuramente, son cuestiones de creciente interés práctico.

El desarrollo de los alimentos funcionales aporta a la alimentación un conjunto de componentes químicos naturales muy apropiados para ayudar al organismo en sus funciones biológicas. Los FOS se usan frecuentemente como componentes de la formulación de alimentos funcionales, siendo los componentes prebióticos más utilizados en la industria alimentaria (Roberfroid & Delzenne, 1998). Los FOS son buenos sustratos para las bacterias intestinales *Bifidobacterium spp.* y *Bacteroides spp.* lo que permite que estos microorganismos crezcan y se desarrollen. La actividad “bifidogénica” de los FOS *in vivo* y la modificación de la actividad bacteriana les confiere un gran abanico de propiedades beneficiosas (Tomomatsu, 1994), especialmente para el recién nacido.

La fermentación anaeróbica de los FOS llevada a cabo por la microbiota del intestino da lugar a la producción de ácidos grasos de cadena corta. Estos ácidos grasos de cadena corta o volátiles disminuyen el pH intestinal (Gibson & Roberfroid, 1995; Hidaka *et al.*, 1986; Koo & Rao, 1991) creando un ambiente desfavorable para el desarrollo de microorganismos patógenos (Gibson & Roberfroid, 1995). Además, el butirato tiene un efecto importante sobre la proliferación y diferenciación de las células de la mucosa intestinal (Flourie *et al.*, 1995). En los últimos años, se ha descrito que las

bacterias del intestino humano del género *Bacteroides*, *Fusobacterium* y cocos anaeróbicos gram positivos sintetizan poliaminas (Noack *et al.*, 1998). Es pues de interés evaluar si el efecto de maduración intestinal producido por los oligosacáridos podría deberse en parte, a que modifican la concentración de poliaminas sintetizadas por la microbiota del intestino.

Las poliaminas putrescina, espermina y espermidina están presentes en casi todas las células procariotas y eucariotas. Las poliaminas pueden ser sintetizadas endógenamente a partir de la arginina. Sin embargo, tejidos con un alto nivel de regeneración como el intestino, dependen de aportes exógenos de poliaminas suministrados por los alimentos, las secreciones intestinales o el metabolismo de la microflora. Además, las poliaminas son compuestos que aparecen de forma natural en la leche materna, ejerciendo efectos tróficos directos sobre las células intestinales inmaduras del neonato, mejorando la permeabilidad de la mucosa (Buts *et al.*, 1995).

Las poliaminas tienen un papel esencial en los procesos de división celular, diferenciación y síntesis de proteínas. Un aumento en el aporte de poliaminas, vía estimulación por los FOS o directamente por adición a la dieta, podría modular el desarrollo intestinal y ser aprovechado incluso en cuadros degenerativos o inflamatorios intestinales.

A continuación se discuten los resultados de la investigación realizada en este trabajo, sobre la suplementación de fórmulas infantiles de inicio con poliaminas y su repercusión en la morfología y actividad del intestino delgado, así como los efectos de la suplementación de fórmulas infantiles con FOS sobre la microbiota del ciego y producción de poliaminas a este nivel del intestino grueso.

## **1. INFLUENCIA A NIVEL DEL INTESTINO DELGADO, DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA CON POLIAMINAS**

El destete es un único y difícil periodo en la vida del cerdo donde el animal es estresado por un cambio en la nutrición, es eliminado de la camada, y tiene un cambio de ambiente físico. El proceso de maduración intestinal incluye cambios importantes

relativos al peso de la mucosa, arquitectura vellosidades/criptas, y actividades enzimáticas intestinales. Los cambios en la morfología intestinal y una reducción de las actividades enzimáticas del intestino delgado disminuyen su capacidad digestiva y de absorción y son procesos que están asociados con el proceso de destete (Hedemann *et al.*, 2006). El destete se asocia a menudo con un período variable de bajo consumo de alimento que dura de 2 a 3 días. Esta anorexia temporal es uno de los principales determinantes de la alteración de la estructura de la mucosa intestinal observada en lechones destetados. Además, el estrés relacionado con el destete y los cambios en la naturaleza de la dieta van a contribuir al proceso de maduración intestinal (Marion *et al.*, 2005).

La leche materna contiene importantes cantidades de poliaminas, principalmente espermina y espermidina y en menor cantidad putrescina (**Tabla 28**). Las poliaminas están implicadas en los procesos de desarrollo y maduración intestinal. El papel y la actividad biológica de estas sustancias en el crecimiento intestinal y en la permeabilidad epitelial en los recién nacidos es un tema de máximo interés, especialmente en niños con un intestino inmaduro (Buts, 1996). La concentración de poliaminas es 10 veces mayor en la leche humana que en las fórmulas infantiles. La concentración de poliaminas en leche de cerda es mucho mayor que en leche humana lo que respondería a la mayor velocidad de crecimiento de estos animales respecto a humanos (destete del cerdo 21 días, destete del humano 4 meses) (**Tabla 28**).

<b>Tabla 28.</b> Concentración de poliaminas en leche de cerda y leche humana (nmol/ml)			
	<b>PUTRESCINA</b>	<b>ESPERMIDINA</b>	<b>ESPERMINA</b>
<b>Leche cerda</b> (n = 10)	1,04 ± 0,62	21,19 ± 2,41	4,87 ± 1,57
<b>Leche humana</b> (n = 90)	0,73 ± 0,05	2,84 ± 0,17	3,82 ± 0,23

Por otra parte, la concentración de poliaminas varía durante la lactancia. Las concentraciones de espermina y espermidina aumentan notablemente durante los primeros días de lactancia (Buts, 1996). En leche de cerda se ha encontrado un perfil similar de poliaminas a la leche humana encontrándose las mayores concentraciones de poliaminas en el calostro y en la primera semana de lactancia (Motyl *et al.*, 1995). El aumento significativo en la concentración de poliaminas en la leche humana durante la primera semana de lactancia plantea la cuestión de los efectos fisiológicos de estas sustancias en el recién nacido. No obstante, también es posible que los primeros cambios en los niveles de poliaminas de la leche se limiten a reflejar una mayor actividad metabólica y tasa de síntesis de proteínas de la glándula mamaria; un fenómeno similar que se produce en la leche de otras especies de mamíferos. En la glándula mamaria de ratas, la concentración de espermidina aumenta gradualmente durante la preñez y la lactancia, alcanzando un máximo el día 13 posparto que es casi 40 veces la concentración de espermidina medida en ratas vírgenes (Russell & McVicker, 1972). Del mismo modo, en la leche porcina, la concentración de espermidina aumenta cuatro veces entre la semana 3 y 7 posparto, lo que coincide con el rápido aumento en el contenido de ARN en la mucosa intestinal, la concentración de espermidina y la expresión de maltasa (Kelly *et al.*, 1991).

Para estimar la cantidad de poliaminas a adicionar a la fórmula láctea, se realizó un análisis de poliaminas en leche de cerda en distintos días de lactancia (**Tabla 10**) y se estimaron unas concentraciones medias de espermidina y espermina de 20 nmol/ml y 5 nmol/ml respectivamente, que fueron usadas en este estudio. Los cerdos fueron destetados con sólo dos días de vida y se pudo observar que la alimentación con una fórmula láctea suplementada con poliaminas a las dosis fisiológicas de la leche materna de cerda aumentó significativamente la profundidad de las criptas del intestino delgado de los animales (grupo control  $132,7 \pm 4,4 \mu\text{m}$  vs. grupo poliaminas  $149,6 \pm 2,2 \mu\text{m}$ ) (**Figura 21**). Además, la longitud de vellosidades intestinales mostró una tendencia a valores mayores en los cerdos alimentados con poliaminas en comparación con los lechones alimentados con la fórmula control ( $403,6 \pm 12,3 \mu\text{m}$  vs.  $393,6 \pm 20,8 \mu\text{m}$ ) y una correlación positiva con la profundidad de las criptas (**Figuras 23 y 25**). Löser *et al.* (1999) observaron también efectos beneficiosos en la administración de poliaminas a

dosis fisiológicas sobre el peso de la mucosa del intestino delgado y el contenido en proteínas de los órganos en ratas lactantes.

Muchos estudios han evaluado los efectos de la ingesta oral de poliaminas a dosis no fisiológicas sobre la histología intestinal con resultados contradictorios (Dorhout *et al.*, 1997; Grant *et al.*, 1990; Peulen *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2006). Además, las distintas poliaminas no tienen la misma actividad biológica. Grant *et al.* (1990) no encontraron diferencias en la altura de vellosidades ni en la profundidad de las criptas de yeyuno a pesar de utilizar grandes concentraciones de putrescina (25 g/kg dieta) en lechones de 2 a 14 días de edad. Sin embargo, Cheng *et al.* (2006) observaron una mayor profundidad de las criptas y una reducción de la altura de vellosidades en el yeyuno de lechones suplementados con dosis de espermina de 0,3 a 0,5 mmol/kg peso/día. Un estudio realizado en ratas que recibían 5  $\mu\text{m}$  de espermidina y 3  $\mu\text{m}$  de espermina dos veces al día, muestra un aumento significativo en la medida de la profundidad de las criptas el día 10 postparto mientras que en la altura de las vellosidades intestinales no se observó ese incremento hasta el día 15 postparto (Dorhout *et al.*, 1997).

Los enterocitos migran desde las criptas hasta las vellosidades, aumenta así la función mitocondrial para abastecer el incremento de demanda metabólica de las células por la absorción de nutrientes. La actividad ODC y las poliaminas son necesarias en el aumento de la función mitocondrial y tienen un papel esencial en el mantenimiento de la integridad mitocondrial en el proceso de maduración de los enterocitos que migran desde las criptas a las vellosidades (Madsen *et al.*, 1996). Esto podría explicar el hecho de que en nuestro estudio las criptas presenten un mayor grado de maduración que las vellosidades intestinales, ya que el proceso de maduración intestinal empieza en las criptas intestinales y se va extendiendo a lo largo de la vellosidad.

A medida que el cerdo crece, su capacidad digestiva aumenta a excepción de la enzima lactasa que en la mucosa intestinal disminuye con la edad (Manners, 1976). La actividad de las enzimas que se localizan en el borde en cepillo de los enterocitos se modifica con el paso de comida líquida a sólida. Así la actividad lactasa disminuye mientras que las actividades maltasa y sacarasa aumentan. Se ha visto que la espermina

induce la maduración intestinal incrementando las actividades de las enzimas maltasa y sacarasa y disminuyendo la lactasa de forma similar al proceso natural que ocurre en el destete (Peulen *et al.*, 1998).

En el presente estudio las actividades de las enzimas disacaridasas no mostraron diferencias estadísticas entre los animales alimentados con la fórmula suplementada con poliaminas respecto a los controles y el grupo de leche materna. Sin embargo, varios autores han descrito que la administración de poliaminas por vía oral induce cambios en la actividad de estas enzimas intestinales similares a los que ocurren durante la maduración normal, aunque siempre usando dosis de poliaminas no fisiológicas ( $\mu\text{mol}$  en lugar de  $\text{nmol}$  de poliaminas) (Buts *et al.*, 1993; Kaouass *et al.*, 1994; Ter Steege *et al.*, 1997; Peulen *et al.*, 2004; Peulen *et al.*, 2004). Dufour *et al.* (1988), mostraron que la administración oral de espermidina ( $10 \mu\text{mol}/\text{día}$ ) y espermina ( $6 \mu\text{mol}/\text{día}$ ) en ratas, disminuía la actividad lactasa mientras que las actividades sacarasa y maltasa aumentaban. Estos resultados también fueron confirmados por otros autores (Buts *et al.*, 1993; Wild *et al.*, 1993; Harada *et al.*, 1994; Dorhout *et al.*, 1996; Peulen *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2006). En ratas lactantes, se ha visto una respuesta dosis-dependiente de las enzimas de las microvellosidades (lactasa, sacarasa y maltasa) con la administración de espermina, aunque estos cambios fueron indetectables a cantidades fisiológicas de poliaminas en la dieta (Buts *et al.*, 1993).

La actividad fosfatasa alcalina también cambia a nivel de la mucosa intestinal con el destete. En ratas se ha visto que el día 14 de la etapa neonatal la actividad fosfatasa alcalina se localiza principalmente en el borde en cepillo y en un sistema tubulovesicular apical. Al destete, este sistema vesicular desaparece y la actividad fosfatasa alcalina se localiza únicamente en el borde en cepillo de la región de duodeno y yeyuno (Ono, 1975). En el presente estudio, los lechones alimentados con la fórmula suplementada con poliaminas mostraron una tendencia a mayores niveles en las actividades fosfatasa alcalina y  $\gamma$ -GT en la mucosa de yeyuno respecto a los otros grupos de animales, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Figuras 27 y 28**). Dado que la actividad fosfatasa alcalina se ve aumentada en el organismo en los procesos de crecimiento (Sánchez de Medina *et al.*, 1993), la

suplementación de poliaminas podría mejorar esta actividad ya que las poliaminas promueven la diferenciación celular (Bardócz *et al.*, 1995).

Peulen *et al.* (2004) encontraron un aumento de la actividad enzimática fosfatasa alcalina después de tres días de suplementación con espermina a dosis no fisiológicas (0,4  $\mu\text{mol/g}$  de peso corporal), probablemente debido a una alta modulación post-transcripcional. Ellos explican que este aumento podría ser debido al incremento de la actividad fosfatasa alcalina que se produce en el lumen del intestino delgado debido a la maduración del duodeno inducida por la espermina, esto daría lugar a una contaminación del yeyuno, incrementando de forma artificial la actividad fosfatasa alcalina. Otra explicación del incremento de la actividad fosfatasa alcalina en el yeyuno podría ser por la propia ingesta de espermina. Sin embargo, en otro estudio, los mismos autores informaron de una tendencia a la reducción de la actividad fosfatasa alcalina de yeyuno. Esto fue explicado por una reducción de la altura de las vellosidades en estos animales y los autores sugirieron que la parte superior de la vellosidad, donde esta enzima se localiza principalmente, se elimina como resultado de una mayor tasa de renovación celular (Peulen *et al.*, 2004). Nosotros también encontramos una correlación positiva entre el número de células por longitud de vellosidad y la actividad fosfatasa alcalina, pero no encontramos una reducción en estos parámetros.

En este trabajo, las poliaminas de la dieta no afectaron de forma significativa a las concentraciones de putrescina, espermidina ni espermina de la mucosa intestinal (**Figura 31**). En nuestro estudio los lechones fueron privados de alimento durante al menos 8 horas antes de ser sacrificados. Estos resultados podrían explicarse porque las poliaminas son moléculas de rápida absorción que desaparecen rápida y totalmente del lumen intestinal y pasan al torrente sanguíneo (Milovic, 2001; Dorhout *et al.*, 1996). Biol-N'Garagba *et al.* (2002) determinaron los niveles de putrescina en el intestino delgado de ratas durante las 24 horas siguientes a su ingesta, y observaron que los niveles de putrescina aumentaban gradualmente hasta alcanzar el máximo a las 4 horas después del tratamiento, y después desciende hasta alcanzar su nivel basal. Löser *et al.* (1999) no observaron cambios significativos en las concentraciones de poliaminas en la mucosa del intestino delgado de ratas alimentadas con poliaminas a dosis fisiológicas durante 26 semanas.

En lo que respecta a las dosis no fisiológicas, Grant *et al.* (1990) mostraron que la putrescina en la dieta (25 g/kg dieta seca) de lechones recién nacidos aumentó la concentración de esta poliamina en la mucosa, mientras que las concentraciones de espermidina y espermina se mantuvieron sin cambios. Otros estudios han evaluado los niveles de espermina en el intestino delgado después de su ingesta y tampoco han observado cambios en su concentración (Peulen *et al.*, 2004; Loret *et al.*, 2000). Así pues, las concentraciones de poliaminas en mucosa de intestino delgado están muy reguladas y parecen estables.

En cuanto a los efectos de las poliaminas en el desarrollo y la maduración del intestino delgado, nuestros resultados muestran que la administración oral de poliaminas a dosis fisiológicas podría mejorar el desarrollo y el crecimiento del intestino delgado. Los cambios positivos se observaron en algunos marcadores bioquímicos y morfológicos asociados a la maduración intestinal, tales como una tendencia a mayores actividades enzimáticas específicas (fosfatasa alcalina y gamma glutamil transferasa), y cambios histológicos significativos en la región de yeyuno tales como la profundidad de las criptas intestinales. Sin embargo, en el presente estudio, la ingesta de espermidina y espermina no mejoró las actividades de las disacaridasas intestinales ni aumentó de forma significativa la longitud de las vellosidades intestinales, posiblemente debido a que el período de administración de poliaminas fue corto con respecto tiempo total de maduración intestinal de los lechones. No se puede excluir que si el período de administración de poliaminas se prolongara para cubrir todo el tiempo de lactancia de los lechones (13 días de administración de suplemento en este estudio en comparación con los 25-29 días que dura período de lactancia), los cambios en estos parámetros enzimáticos también podrían haber sido significativos.

## **2. INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN DE FOS EN LA DIETA Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE POLIAMINAS BACTERIANAS**

En la leche materna el contenido de los componentes hidrocarbonados mono-, di- y oligosacáridos es máximo en las primeras semanas de vida del lactante y desciende

significativamente después (Coppa *et al.*, 1999). La mayor parte de los efectos fisiológicos de los oligosacáridos están relacionados con su digestión en el intestino grueso. Aquellos que no son degradados por los enzimas digestivos del intestino delgado son considerados como la fibra dietética de la leche materna, ya que ejercen un efecto fisiológico similar a la fracción soluble de dicha fibra (Engfer *et al.*, 2000).

Se estima que un 40% de los oligosacáridos ingeridos se excretan en heces, mientras que el 1% es absorbido y excretado en la orina. Esto indica que aproximadamente el 60% de los oligosacáridos ingeridos son utilizados parcial o totalmente por la microbiota colónica (McVeagh & Miller, 1997). La presencia de un gran número de enzimas bacterianas entre las que se encuentran las fucosilasas y las sialasas de las bacterias colónicas, hace pensar que estos organismos son los responsables de la hidrólisis de los oligosacáridos y que éstos son sustratos de la fermentación colónica.

Los oligosacáridos no digestibles son sustratos específicos de las bifidobacterias. Estas bacterias se caracterizan porque metabolizan la glucosa por la vía de la fructosa-6-fosfato (“ruta bífida”), debido a la presencia de enzimas 2,1-beta-D-fructan-fructanohidrolasas, que hidrolizan la fructosa del extremo no reducido de algunos azúcares en posición beta-2,1, originando como productos finales acetato y lactato (Orrhage & Nord, 1999).

Durante el primer año de vida, los lactantes necesitan una protección adicional frente a patógenos debido a que presentan un mayor pH gástrico e inmadurez de su sistema inmune (Gudiel-Urbano & Goñi, 2001). La colonización bacteriana del tracto gastrointestinal del recién nacido se inicia en el momento del parto, cuando aquél entra en contacto con la flora bacteriana de la madre. En un primer momento, el recién nacido presenta una flora semejante a la de la vagina y área perianal de la madre, caracterizada por el predominio de bacterias aerobias o de anaerobios facultativos, tales como *E. coli*, otras enterobacteriáceas, y estafilococos, además de los enterococos entre los aerotolerantes (Yoshioka Iseki & Fujita, 1983). A medida que estos organismos consumen el oxígeno, el entorno se vuelve más adecuado para las bacterias anaerobias (*Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. y *Bacteroides* sp.). Con una alimentación

exclusiva de leche materna entre el primer y tercer mes de vida se incrementa el número de bifidobacterias (aproximadamente hasta  $10^{10}$  por gramo) haciéndose predominantes en el conjunto de la microbiota bacteriana (Gudiel-Urbano & Goñi, 2001).

Los alimentos que ingiere el lactante son en parte los responsables de los cambios que tienen lugar en la microbiota colónica. Se ha visto que los niños alimentados con lactancia artificial presentan un menor número de bifidobacterias que los niños alimentados con lactancia natural. Al finalizar la primera semana de vida, el género *Bifidobacterium* representa 95% del total de la población bacteriana en heces de los lactantes alimentados exclusivamente a pecho mientras que en los lactantes alimentados con leche de fórmula las bifidobacterias suponen menos del 70% (Yoshioka Iseki & Fujita, 1983).

Los efectos de la fermentación colónica son beneficiosos para la salud. Suponen un aporte calórico importante para el crecimiento bacteriano y para el huésped (Oku, 1996). Los AGCC (acetato, propionato y butirato), el lactato y el succinato hacen disminuir pH intestinal, lo que crea un medio ácido desfavorable para el crecimiento de algunas bacterias patógenas como son *E. coli*, *Shigella sp*, *Streptococcus fecalis* y *Clostridium sp*. que se convierten en predominantes tras el período de diversificación (McVeagh & Miller, 1997). Los AGCC ejercen también un efecto vasodilatador local, por lo que se incrementa la absorción de agua y sales en el intestino grueso. La mayor reabsorción de agua protege frente a la diarrea y además los AGCC también constituyen estímulos químicos de la motilidad intestinal, que junto con los estímulos mecánicos producidos por el incremento de gases y la masa bacteriana, estimulan la velocidad de tránsito (Kien *et al.*, 1998).

En la industria alimentaria, los oligosacáridos simples como los FOS se utilizan como oligosacáridos bifidogénicos y algunos productos infantiles como leches de continuación y cereales los contienen con la esperanza de que esto podría proporcionar alguno de los beneficios atribuidos a los oligosacáridos de la leche materna (Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001). Sus efectos en leches de inicio están todavía bajo investigación.

En el presente estudio, la alimentación de los animales de 2-15 días de edad con la fórmula láctea suplementada con FOS a dosis fisiológicas (respecto leche materna) originó un aumento significativo de las concentraciones de *Bifidobacterium* (grupo control  $10,3 \times 10^9$  ufc/g masa seca vs. grupo FOS  $17,5 \times 10^9$  ufc/g masa seca) y *Lactobacillus* (grupo control  $59,7 \times 10^8$  ufc/g masa seca vs. grupo FOS  $69,2 \times 10^8$  ufc/g masa seca) (**Figuras 34 y 35**), así como en los niveles de poliaminas del contenido cecal de los lechones neonatales (grupo control  $502,9 \pm 205,2$  nmol/g masa seca vs. grupo FOS  $890,3$  nmol/g masa seca) (**Figura 44**).

Muchos estudios han confirmado la actividad bifidogénica de los FOS (Bouhnik *et al.*, 1996; Hidaka *et al.*, 1986; Hidaka *et al.*, 1991) y nuestros resultados muestran en este mismo sentido que los FOS a dosis de 8 g/L incrementan de forma significativa las poblaciones de bifidobacterias, lactobacilos así como el recuento de microorganismos anaerobios, mientras que la concentración de bacterias como los aerobios totales, enterobacterias y clostridios permanecieron sin cambios significativos. Por el contrario, el recuento de mohos y levaduras fue significativamente menor en el grupo de animales alimentado con FOS respecto al grupo control (**Figuras 32-38**). La competencia por nutrientes puede ser el factor regulador más importante para la distribución de las poblaciones bacterianas; asimismo los oligosacáridos no digeribles poseen potencial como sustratos para bacterias probióticas como lactobacilos y bifidobacterias, pero no promueven el crecimiento de organismos como clostridios y coliformes (Gibson, 1998; Figueroa *et al.*, 2006).

La síntesis procariota de putrescina a partir de la arginina es muy conocida, mientras que muchos procariotas no contienen la enzima espermina sintasa para la síntesis de espermina (Tabor & Tabor, 1985). En nuestro estudio la putrescina fue la poliamina que se produjo en mayor cantidad en el contenido cecal de los animales, seguida de la espermidina y la espermina (**Figura 44**).

Los resultados del presente estudio también muestran que la putrescina fue la principal poliamina producida en el contenido cecal del grupo de animales alimentado con FOS, en cambio, las poliaminas predominantes en el tejido cecal fueron espermidina y espermina. Así, la concentración de poliaminas en el contenido cecal

podría atribuirse a la microbiota intestinal que produce principalmente putrescina, mientras que las células de la mucosa al poder sintetizar sus propias poliaminas a partir de la ornitina, pueden presentar diferentes patrones de poliaminas. En concordancia con lo encontrado en este trabajo, Noack *et al.* (1998) observaron altas concentraciones de putrescina en el contenido cecal de ratas alimentadas con goma guar, y especialmente en ratas alimentadas con pectina. En un nuevo estudio, estos autores (Noack *et al.*, 2000) observaron que el consumo de pectina por ratas daba lugar a un aumento en las concentraciones las poliaminas del ciego (putrescina, espermidina y espermina) a través de dos posibles mecanismos: estimulación de la síntesis bacteriana de poliaminas y disminución de poliaminas del ciego a las heces, lo que sugiere que las poliaminas bacterianas son absorbidas en ciego y colon. También se ha descrito que la espermidina es la poliamina más abundante tanto en el contenido cecal como en el tejido cecal de ratas (Delzenne *et al.*, 2000). Estos resultados contradictorios, tanto los de otros autores considerados en su conjunto, como los obtenidos en este trabajo se comparan con ellos, muestran la necesidad de llevar a cabo más estudios para aclarar los niveles y los efectos de las poliaminas en la mucosa cecal.

Las concentraciones de poliaminas en el contenido cecal de los lechones fueron significativamente mayores en el grupo FOS que en el grupo control (**Figura 44**), un resultado que confirma que el contenido de poliaminas en el intestino está muy influenciado por la actividad metabólica de las bacterias intestinales. Esto nos lleva a preguntarnos si los FOS promueven el crecimiento de bacterias altamente productoras de poliaminas. Según algunos autores, las bacterias que inducen la producción de putrescina son principalmente los cocos anaerobios gram positivos y las fusobacterias, mientras que los miembros del género *Bacteroides* son considerados productores de espermidina (Noack *et al.*, 1998). La capacidad de las bifidobacterias y los lactobacilos para producir poliaminas es interesante para poder determinar su papel en la modulación de la producción de poliaminas cecales por los FOS de la dieta.

Nuestros estudios *in vitro* han demostrado, por primera vez, la capacidad de 3 cepas de *Bifidobacterium* (aisladas en laboratorio a partir del contenido cecal de los cerdos) para producir poliaminas. Las cepas aisladas de *L. acidophilus* y *L. fermentum* también fueron capaces de producir poliaminas (**Tabla 26**). Estos grupos microbianos

fueron especialmente favorecidos por el consumo de FOS (**Figuras 34 y 35**), y este hecho podría explicar el efecto de los FOS para incrementar los niveles de poliaminas del contenido cecal. Cabe señalar, sin embargo, que Noack J *et al.* (Noack *et al.*, 1998) describieron la incapacidad de las cepas de *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum* para producir poliaminas. Estas cepas fueron obtenidas de la “American Type Culture Collection, Rockville, MD” y cultivadas en un medio libre de poliaminas pero que contenía una mezcla de aminoácidos entre ellos lisina y arginina.

Se sabe que la concentración de poliaminas está fuertemente influenciada por las condiciones de cultivo. El pH del medio, condiciones de aireación, presencia de aminoácidos como arginina o lisina, edad del cultivo y la tasa de crecimiento (Tabor & Tabor, 1985). En cultivos donde se acumula ornitina o arginina a causa de un bloqueo metabólico o genético, se produce un incremento de aminos debido a la descarboxilación de estos aminoácidos (Tabor & Tabor, 1985). Las bacterias sintetizan poliaminas por descarboxilación de los aminoácidos ornitina, arginina y lisina (Macfarlane & Macfarlane, 1997). De hecho, las 3 cepas de *Bifidobacterium* así como las cinco cepas de *Lactobacillus* que fueron aisladas en nuestro laboratorio, produjeron mayores niveles de poliaminas cuando el medio de Falkow fue suplementado con ornitina (0,5% w/v). La poliamina predominante producida fue la putrescina, que es sintetizada directamente a partir de la ornitina por una reacción catalizada por la enzima ornitina decarboxilasa (ODC).

No obstante, aunque el consumo de FOS aumentó los niveles de poliaminas en el contenido cecal de los lechones (grupo control  $502,9 \pm 205,2$  nmol/g sustancia seca *vs.* grupo FOS  $890,3 \pm 190,9$  nmol/g sustancia seca), este consumo determinó una cierta disminución de la concentración de poliaminas en el tejido cecal (grupo control  $4,37 \pm 1,06$  nmol/mg prot. *vs.* grupo FOS  $1,61 \pm 0,36$  nmol/mg prot.), estando la espermidina y la espermina en mayor cantidad que la putrescina. Parece que la cantidad de poliaminas producida por la microflora en cuestión no fue suficiente para modificar el contenido en poliaminas de la mucosa, aunque cabe la posibilidad de que la propia mucosa las haya utilizado para su propio metabolismo, ya que la absorción de poliaminas por el intestino es muy rápida y completa (Milovic, 2001; Biol-N'Garagba *et*

*al.*, 2002), y nuestros animales estuvieron sometidos a un periodo de ayunas de más de 8 horas.

Osborne & Seidel (1990) observaron que la concentración de las poliaminas putrescina y cadaverina en el colon era mucho menor que en el yeyuno; sin embargo, los niveles de las actividades enzimáticas responsables de la síntesis de poliaminas fue significativamente mayor en el colon que en yeyuno. Esto sugiere la posibilidad de la circulación enterohepática de las poliaminas que, siendo sintetizadas por la microbiota del colon, serían transportadas a la región proximal del tubo digestivo a través de la circulación porta y el árbol biliar. Lo anterior también podría explicar que en este estudio los niveles de poliaminas del contenido cecal hubieran aumentado por el consumo de FOS, pero el hecho no habría sido detectado a nivel de la mucosa cecal por el inmediato transporte de las poliaminas mencionado anteriormente.

En este trabajo, las actividades de las enzimas fosfatasa alcalina y  $\gamma$ -GT y las medidas de la profundidad de las criptas fueron respectiva y significativamente más bajas y menores en los lechones alimentados con FOS que en los alimentados con la fórmula control, aunque no presentaron diferencias a este respecto con el grupo de leche materna. Hedemann *et al.* (2006) mostraron que la profundidad de las criptas en el colon de cerdos alimentados con diferentes fibras no se modificó por la dieta; es más, cuando utilizaron pectina, la profundidad de las criptas fue aún menor. Además, Benamouzig *et al.* (1999) no observaron cambios en la proliferación celular en la mucosa colónica, a pesar de observar mayores niveles de poliaminas en el tejido. Delzenne *et al.* (2000) observaron que en ratas alimentadas con una dieta suplementada con oligofruktosa (10%), la concentración de putrescina en el contenido cecal casi se duplicaba y que los niveles de las tres poliaminas en el tejido cecal fueron significativamente mayores que en los controles, aunque las medidas histológicas del tejido cecal no mostraron ninguna diferencia (proliferación celular, profundidad de las criptas, altura de las vellosidades). En cambio, Howard *et al.* (1995b) vieron que el consumo de FOS en cerdos incrementaba la altura de las criptas de la mucosa colónica proximal, lo que sugiere que los ácidos grasos de cadena corta están disponibles para la actividad proliferativa cuando se suministraron los FOS; aunque sorprendentemente, estos autores no

observaron diferencias en los niveles de ácidos grasos de cadena corta con el consumo de FOS.

Los lactantes suelen tener valores de pH más bajos (5,0 a 7,0) en el ciego y colon que los niños alimentados con fórmulas (Hidaka *et al.*, 1991; Balmer & Wharton, 1989). Este hecho se justifica por la fermentación de los FOS por la microbiota intestinal que da lugar a la producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales tienen varias funciones, entre ellas ser fuente de energía para los colonocitos, regular el crecimiento celular y disminuir el pH intestinal, lo que puede contribuir a inhibir el crecimiento de patógenos (Wang & Gibson, 1993) y seleccionar una microbiota que podría promover la producción de poliaminas (Noack *et al.*, 2000). Sin embargo, se han descrito resultados contradictorios sobre el efecto de los FOS en el pH cecal de cerdos, ratas y seres humanos (Howard *et al.*, 1995; Bouhnik *et al.*, 1996; Noack *et al.*, 1998; Knol *et al.*, 2005). En nuestro estudio, los valores de pH del contenido cecal no difirieron entre las distintas dietas y tuvieron un valor ligeramente por debajo de 7,0. El motivo podría ser la liberación de poliaminas al contenido cecal por parte de los microorganismos, lo que elevaría los valores de pH del contenido cecal. Por el contrario, otros autores han descrito que las fórmulas infantiles suplementadas con FOS (8 g/L) disminuyen significativamente el pH fecal en los lactantes, lo que indica cambio en la actividad metabólica de la microbiota cecal (Moro *et al.*, 2002; Knol *et al.*, 2005).

Las concentraciones de poliaminas producidas por las comunidades naturales de bacterias obtenidas del contenido cecal de los cerdos cultivadas en medio de Falkow suplementado con ornitina, no mostraron diferencias significativas entre los cerdos alimentados con la fórmula control y los que fueron alimentados con la fórmula suplementada con FOS, a pesar de que los niveles de poliaminas eran más altos en el contenido cecal del grupo FOS. No obstante, la concentración total de poliaminas fue ligeramente mayor en el grupo FOS que en el grupo control.

Un estudio *in vitro* utilizando cepas puras obtenidas a partir de bacterias del colon y una mezcla de bacterias cecales humanas, ha demostrado que, en comparación con otros carbohidratos simples o complejos, los FOS son selectivamente fermentados por la mayoría de cepas de bifidobacterias (Wang & Gibson, 1993). Además, cuando las

bifidobacterias crecen en tales sustratos, parecen hacerlo a expensas del crecimiento de bacteroides, clostridios o coliformes, que se mantienen en niveles muy bajos, o pueden incluso ser reducidos (Wang & Gibson, 1993). Esta capacidad degradativa de los FOS por las bifidobacterias puede ser debida a la producción de  $\beta$ -fructosidasas, como se ha demostrado en cultivo puro. El mecanismo aceptado por el que bifidobacterias inhiben el crecimiento de otras bacterias es una disminución del pH como consecuencia de la producción de grandes cantidades de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, principalmente acetato y lactato. Sin embargo, éste no es el único mecanismo de inhibición de estas bacterias, como lo demuestran otros experimentos de fermentación, en los cuales, a pesar de que el pH se mantiene neutro, se produce una inhibición en el crecimiento de *Clostridium spp.* y *E. coli* en co-cultivos con *Bifidobacterium infantis* (Gibson & Roberfroid, 1995).

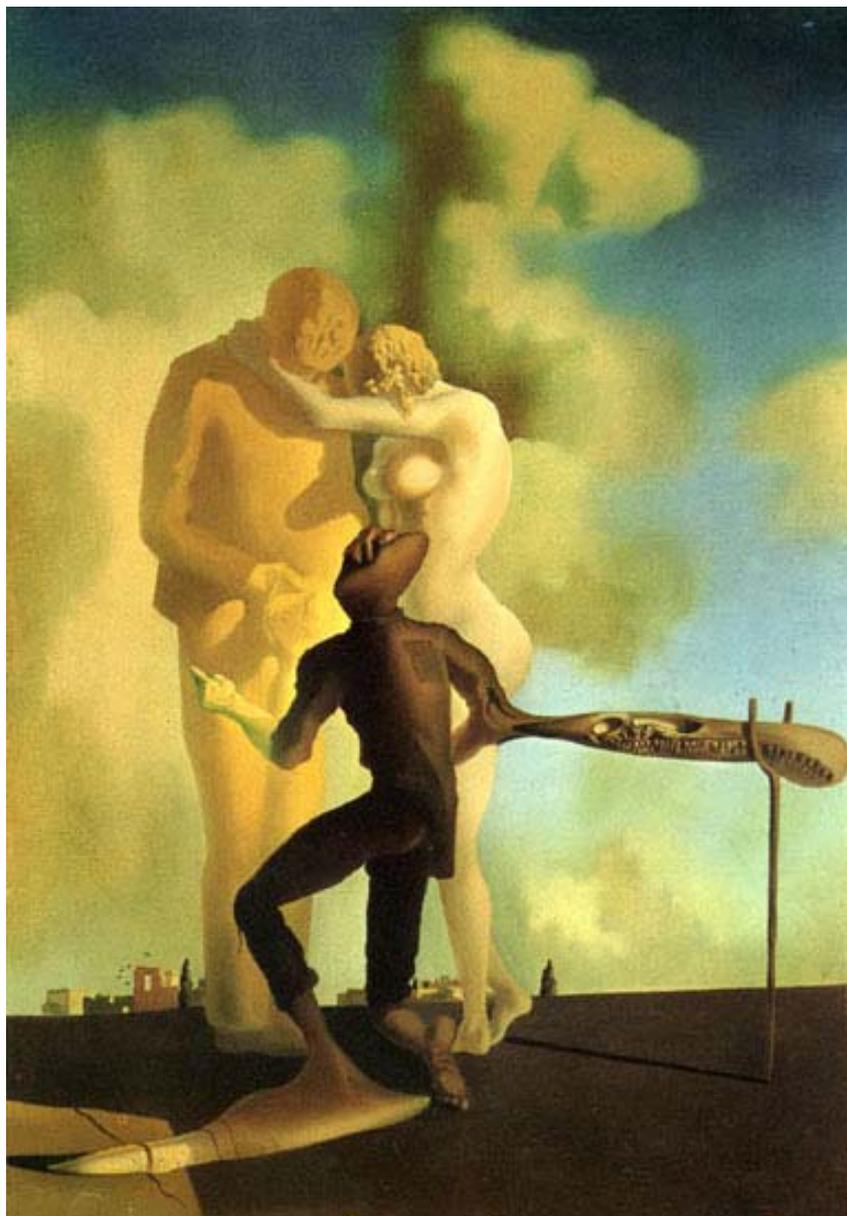
La suplementación de los recién nacidos a término con FOS ha mostrado un efecto dosis-dependiente sobre el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias en el intestino (Moro *et al.*, 2002).

Los resultados de nuestro estudio *in vitro* no muestran una relación dosis-dependiente entre cantidad de FOS añadida y la producción bacteriana de poliaminas, lo que sugiere que sería necesario realizar el estudio dosis-dependiente *in vivo*, ya que son muchos los factores que coexisten en el intestino y que van a condicionar la producción de poliaminas por los microorganismos. Podemos afirmar que *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son capaces de producir poliaminas y que el consumo de FOS incrementó el recuento de estas cepas así como la concentración de poliaminas del contenido cecal. Esto nos lleva a pensar que este aumento de poliaminas del contenido cecal es debido a estos microorganismos que fueron seleccionados por el consumo de FOS. Pero el comportamiento de los microorganismos *in vitro* no ha sido igual, es decir, la producción de poliaminas *in vitro* no se ha visto incrementada con la concentración de FOS y puede que debido a las condiciones de laboratorio estas cepas no sean las principales productoras de poliaminas. Es posible que la actividad bifidogénica de los FOS reduzca el crecimiento de bacterias que producen altos niveles de poliaminas *in vitro*. Sin embargo, *in vivo* el consumo de FOS aumentó las poblaciones de otras especies bacterianas, como el total de anaerobios, que incluyen los géneros

*Fusobacterium*, *Bacteroides* y cocos anaerobios grampositivos que se ha visto que aumentan la concentración de poliaminas en ratas (Noack *et al.*, 1998). Noack *et al.* (2000) sugieren que la formación de poliaminas por diversas especies bacterianas en el intestino es estimulada por la oferta de sustrato metabolizable. Así pues sería interesante corroborar en un estudio dosis dependiente *in vivo*, el efecto que tiene el consumo de FOS a distintas concentraciones en los niveles de poliaminas cecales y su repercusión a nivel fisiológico.



## *VI. Conclusiones*



*Meditación sobre el arpa, Dalí 1934*



## **VI. CONCLUSIONES**

### **CONCLUSIÓN 1**

La suplementación de una fórmula láctea con poliaminas (espermina y espermidina), a dosis semejantes a las de la leche materna, produjo a nivel intestinal en la región de yeyuno, zona en la que tiene lugar una mayor absorción de nutrientes, un aumento significativo en la medida de la profundidad de las criptas y una tendencia a una mayor longitud de las vellosidades intestinales.

### **CONCLUSIÓN 2**

La actividad de las enzimas de membrana fosfatasa alcalina y  $\gamma$ -glutamyl transferasa, aumentaron en la mucosa de yeyuno en el grupo de animales alimentado con la fórmula láctea suplementada con poliaminas, lo que refuerza la teoría de que las poliaminas tienen un efecto positivo sobre la maduración intestinal en la etapa neonatal. No obstante los resultados de los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas.

### **CONCLUSIÓN 3**

El consumo de poliaminas a dosis fisiológicas no modificó los niveles de poliaminas en las mucosas de yeyuno e íleon de los animales. Este hecho, podría ser debido a que las poliaminas son absorbidas por el lumen intestinal con rapidez y su paso a la circulación es rápido y completo. Además, la medida de poliaminas se realizó tras un periodo de ayunas de al menos 8 horas.

### **CONCLUSIÓN 4**

La alimentación de los lechones con una fórmula láctea suplementada con el fructooligosacárido Raftilosa P95 (8 g/L), a dosis fisiológicas respecto a los oligosacáridos de la leche materna, aumentó de forma significativa el recuento de bifidobacteras en medio "Berens" y el recuento de lactobacilos en medio "Rogosa" así

como el número de unidades formadoras de colonias de anaerobios totales en el contenido cecal, lo que pone de manifiesto que el FOS administrado es capaz de modificar selectivamente la microbiota del intestino grueso de forma saludable.

#### CONCLUSIÓN 5

La ingesta del fructooligosacárido Raftilosa P95 a dosis fisiológicas produjo una disminución drástica del número de mohos y levaduras del contenido cecal de los animales. Esta disminución, como en el caso anterior, resulta de importancia positiva para el hospedador.

#### CONCLUSIÓN 6

El consumo del fructooligosacárido Raftilosa P95 a dosis fisiológicas produjo una disminución en la profundidad de las criptas de ciego que se correlacionó con la actividad de las enzimas de membrana fosfatasa alcalina y  $\gamma$ -glutamyl transferasa de la mucosa de ciego. Este hecho contrasta con los efectos beneficiosos de los FOS sobre la microbiota.

#### CONCLUSIÓN 7

La alimentación de cerdos destetados precozmente con una fórmula suplementada con FOS a dosis fisiológicas durante 13 días incrementó la concentración de poliaminas del contenido cecal (principalmente putrescina) lo que se asocia al incremento en el número de bifidobacterias, lactobacilos y anaerobios totales que se produjo en estos animales. No obstante la suplementación de la fórmula con FOS no produjo modificación en las concentraciones de poliaminas en la mucosa cecal que incluso tendió a valores inferiores respecto a los grupos alimentados con la fórmula control y leche materna, lo que podría deberse a que el metabolismo de las poliaminas está finamente regulado y la absorción de las poliaminas por los enterocitos ocurre por medio de mecanismos saturables.

## CONCLUSIÓN 8

Las cepas de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus* y de *Bifidobacterium sp.* aisladas del contenido cecal de los animales alimentados con FOS son capaces de producir poliaminas en el medio Falkow suplementado con una fuente nitrogenada precursora de estas poliaminas, siendo la putrescina la poliamina que se produjo en mayor cantidad.

## CONCLUSIÓN 9

La suplementación del medio Falkow con el aminoácido ornitina como fuente nitrogenada aumentó de forma significativa la producción de poliaminas por parte de las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aisladas del contenido cecal respecto al medio Falkow sin suplementar o suplementado con arginina o lisina.

## CONCLUSIÓN 10

Las cepas de *Bifidobacterium sp.* mostraron una capacidad de producción de poliaminas significativamente mayor que las cepas de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus acidophilus*, lo que podría justificar los efectos fisiológicos de los FOS a través de la síntesis de poliaminas.

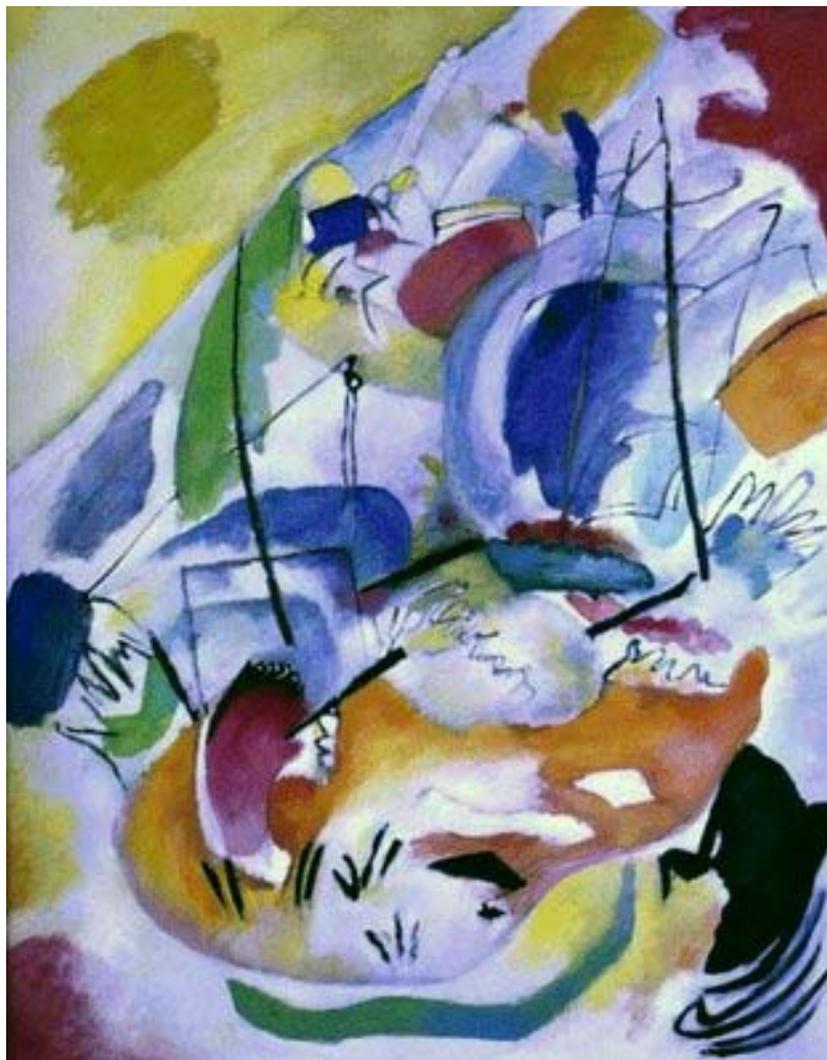
## CONCLUSIÓN 11

La adición de FOS en una relación dosis-dependiente al medio Falkow con ornitina, inoculado con el contenido cecal de los animales alimentados con la fórmula láctea suplementada con FOS y la fórmula control, no mostró variación significativa en la producción de poliaminas bacterianas lo que podría explicarse porque la actividad bifidogénica de los FOS reduzca el crecimiento de bacterias que producen altos niveles de poliaminas *in vitro*. No obstante, son necesarios más estudios microbiológicos para explicar estos resultados.

## CONSIDERACIONES FINALES

Nuestro primer objetivo fue demostrar que las poliaminas a dosis fisiológicas promueven la maduración intestinal en cerdos neonatales. A pesar de que nuestros resultados solo mostraron un aumento significativo en la profundidad de las criptas a nivel de yeyuno, y de que el resto de parámetros indicadores de maduración intestinal no mostraron diferencias significativas, el conjunto de resultados nos dice que las poliaminas juegan un papel importante en la maduración del intestino delgado y quizás un mayor periodo de alimentación sería necesario para apreciar cambios más drásticos. En lo que respecta a la producción de poliaminas bacteriana como posible mecanismo de acción de los fructooligosacaridos, es importante considerar el incremento en la concentración de poliaminas en el contenido cecal de los animales alimentados con FOS así como la disminución significativa de los parámetros indicadores de maduración intestinal en estos mismos animales. La putrescina que fue la poliamina producida en mayor concentración en el contenido cecal no parece tener la misma influencia fisiológica sobre la maduración intestinal que las poliaminas espermina o espermidina administradas directamente. Esta controversia de resultados nos incita a seguir investigando la repercusión fisiológica de las nuevas sustancias adicionadas a las fórmulas infantiles

## *VII. Bibliografía*



*Improvisación 31, Kandinsky 1913*



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arena ME and Manca de Nadra MC (2001) Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology* 90: 158-162.
- Bachrach U (2004) Polyamines and cancer: Minireview article. *Amino Acids* 26: 307-309.
- Balmer SE and Wharton BA (1989) Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Arch Dis Child* 64: 1671-1677.
- Barbul A. (1986) Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *JPEN* 10: 227-238.
- Bardocz S, Grant G, Brown DS and Pusztai A (1998) Putrescine as a source of instant energy in the small intestine of the rat. *Gut* 42: 24-28.
- Bardócz S, Duguid TJ, Brown DS, Grant G, Pusztai A, White A and Ralph A (1995) The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *British Journal of Nutrition* 73: 819-828.
- Baró L, Jimenez J, Martínez-Ferez and Boza JJ (2001) Bioactive compounds derived from human milk. *Ars Pharmaceutica* 42: 21-28.
- Bauske R, Milovic V, Turchanowa L and Stein J (2000) EGF-stimulated polyamine accumulation in the colon carcinoma cell line, Caco-2. *Digestion* 61: 230-236.
- Benamouzig R, Mahé S, Meziani K, Martin A, Juste C, Catala I and Tomé D (1999) Effects of soy protein diet on digestive luminal polyamines and colonic cell proliferation in pigs. *Reprod Nutr Dev* 2: 213-221.
- Biol-N'Garagba M, Greco S, George P, Hugueny I and Louisot P (2002) Polyamine participation in the maturation of glycoprotein fucosylation, but not sialylation, in rat small intestine. *Pediatr Res* 51: 625-634.

Blaut M (2002) Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur J Nutr* 41: 11-16.

Boehm G, Jelinek J, Knol J, M'Rabet L, Stahl B, Vos P and Garsen J (2004) Prebiotics and immune responses. *J Pediatr Gastr Nutr* 39: 772-773.

Boehm G and Stahl B (2007) Oligosaccharides from Milk. *J Nutr* 137: 847S-8849.

Boettcher A (1865) Farblose Krystalle eines eiweissartigen K+Ârpers aus dem menschlichen Sperma dargestellt. *Virchows Archiv* 32: 525-535.

Bornet FRJ (1994) Undigestible sugars in food products. *Am J Clin Nutr* 59: 769.

Bornet FRJ, Brouns F, Tashiro Y and Duvillier V (2002) Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digest Liver Dis* 34: 111-120.

Bouhnik Y, Flourie B, Andrieux C, Bisetti N, Briet F and Rambaud JC (1996) Effects of *Bifidobacterium sp* fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. *Eur J Clin Nutr* 50: 269-273.

Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F and Braesco V (2003) The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The intelligent intestine," in Paris. 78: 675-683.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Brandt L (2001) Prebiotics enhance gut health. *Prepared Foods* 170: 7-10.

Buts JP (1996) Polyamines in milk. *Annales Nestlé* 54: 98-104.

Buts JP, Keyser ND, Raedemaeker LD, Collette E and Sokal EM (1995) Polyamine profiles in human milk, infant artificial formulas, and semi-elemental diets. *J Pediatr Gastr Nutr* 21: 44-49.

- Buts JP (1998) Les facteurs trophiques du lait. *Archives de Pediatrie* 5: 298-306.
- Buts J, Keyser N, Kolanowski J, Sokal E and van Hoof F (1993) Maturation of villus and crypt cell functions in rat small intestine. Role of dietary polyamines. *Digest Dis Sci* 38: 1091-1098.
- Carlson SE (1985) N-acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *Am J Clin Nutr* 41: 720-726.
- Casti A, Bacciottini F, Orlandini G, Reali N, Zannino L and Bernasconi S (1985) Pattern of human blood spermidine and spermine in prematurity. *Clin Chim Acta* 147: 223-232.
- Casti A, Orlandini G, Reali N, Bacciottini F, Vanelli M and Bernasconi S (1982) Pattern of blood polyamines in healthy subjects from infancy to the adult age. *J Endocrinol Invest* 5: 263-266.
- Chemediia. Los frutooligosacaridos. 2008. Ref Type: Electronic Citation
- Chang EB RM (1994) Intestinal water and electrolyte transport. In: Johnson LR (ed) *Physiology of the gastrointestinal tract*, pp 2027-2081. Raven Press, New York.
- Cheng ZB, Li DF, Xing JJ, Guo XY and Li ZJ (2006) Oral administration of spermine advances intestinal maturation in sucking piglets. *Anim Sci* 82: 621-626.
- Ciucanu I and Kerek F (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res* 131: 209-217.
- Collins F and Chandorkar KR (1971) Thin-layer chromatography of fructo-oligosaccharides. *J Chromatogra* 56: 167.
- Conway PL (2001) Prebiotics and human health: the state of the art and future perspectives. *Scand J Nutr* 45: 13-21.

Coppa GV, Pierani P, Zampin L, Carloni I, Carlucci A and Gabrielli O (1999) Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatr* 430: 89-94.

Crittenden RG and Playne MJ (1996) Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Tech* 7: 361.

Dahlqvist A (1964) Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem* 7: 18-25.

Dalla Via L, Di Noto V and Toninello A (1999) Binding of spermidine and putrescine to energized liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 365: 231-238.

Dandriofosse G, Peulen N, El Khefif N, Deloyer P, Dandriofosse A and Grandfils C (2000) Are milk polyamines preventive agents against food allergy? *Proceedings of the Nutrition Society* 59: 81-86.

Daubioul C, De Wispelaere L, Taper H and Delzenne N (2000) Dietary oligofructose lessens hepatic steatosis, but does not prevent hypertriglyceridemia in obese Zucker rats. *J Nutr* 130: 1314-1319.

Daubioul C, Rousseau N, Demeure R, Gallez B, Taper H, Declerck B and Delzenne N (2002) Dietary fructans, but not cellulose, decrease triglyceride accumulation in the liver of obese Zucker fa/fa rats. *J Nutr* 132: 967-073.

Davis RH, Morris DR and Coffino P (1992) Sequestered end products and enzyme regulation: the case of ornithine decarboxylase. *Microbiol Mol Biol Rev* 56: 280-290.

Delzenne NM, Kok N, Deloyer P and Dandriofosse G (2000) Dietary fructans modulate polyamine concentration in the cecum of rats. *J Nutr* 130: 2456-2460.

Delzenne NM. (2003) Oligosaccharides: state of the art. *Proc Nutr Soc* 62: 177-182.

Delzenne N, Aertssens J, Verplaetse H, Roccaro M and Roberfroid M (1995) Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat. *Life Sci* 57: 1579-1587.

Demigné C, Rémésy C and Morand C (1999) Short chain fatty acids. In: G Gibson and M Roberfroid (eds) *Colonic Microbiota, Nutrition & Health*, pp 55-69. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Dorhout B, Van Beusekom CM, Huisman M, Kingma AK, De Hoog E, Rudy Boersma E and Muskiet FAJ (1996) Estimation of 24-hour polyamine intake from mature human milk. *J Pediatr Gastr Nutr* 23: 298-302.

Dorhout B, Van Faassen A, Van Beusekom CM, Kingma AW, De Hoog E, Nagel GT, Karrenbeld A, Boersma ER and Muskiet FAJ (1997) Oral administration of deuterium-labelled polyamines to sucking rat pups: luminal uptake, metabolic fate and effects on gastrointestinal maturation. *Brit J Nutr* 78: 654.

Dowling RH (1990) Polyamines in intestinal adaptation and disease. *Digestion* 46: 331-344.

Duchen K and Thorell L (1999) Nucleotide and polyamine levels in colostrum and mature milk in relation to maternal atopy and atopic development in the children. *Acta Paediatrica* 88: 1338-1343.

Dufour C, Dandrifosse G, Forget P, Vermesse F, Romain N and Lepoint P (1988) Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. *Gastroenterology* 95: 112-116.

Engfer MB, Stahl B, Finke B, Sawatzki G and Daniel H (2000) Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 71: 1589-1596.

Englyst HN, Quigley ME and Hudson GJ (1994) Determination of dietary fiber as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high-performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugars. *Analyst* 119: 1497-1509.

ESPGAN (1977) Committee on Nutrition: Guidelines on infant nutrition: I. Recommendations for the composition of an adapted formula. *Acta Paediatr Scand* 262: 1-20.

Farriol M, Venereo Y, Orta X, Company C, Gomez P, Delgado G and Rodriguez R (2004) Ingesta de antioxidantes y poliaminas en pacientes con quemaduras graves. *Nutrición Hospitalaria XIX*: 300-304.

Farriol M, Segovia-Silvestre Y, Venereo Y and Orta X (2000) Poliaminas en el tracto gastrointestinal. *Nutr Hosp* 15: 85-91.

Farriol M, Segovia T, Venereo Y and Orta X (1999) Importancia de las poliaminas:revisión de la literatura. *Nutr Hosp* 14: 101-113.

Figueroa VJL, Chi MEE, Cervantes RM and Domínguez VIA (2006) Functional foods for weanling pigs. *Vet Mex* 37: 117-136.

Flourie B, Achour L and Briet F (1995) Substrates for fermentation in the human colon. *Cah Nutr Diét* 30: 159-163.

Forget PP, Sinaasappel M, Bouquet J, Deutz NEP and Smeets C (1997) Fecal polyamine concentration in children with and without nutrient malabsorption. *J Pediatr Gastr Nutr* 24: 285-288.

Franck A (2002) Technological functionality of inulin and oligofructose. *Br J Nutr* 87: 287-291.

Fukasawa T, Murashima K, Matsumoto I, Hosono A, Ohara H, Nojiri C, Koga J, Kubota H, Kanegae M, Kaminogawa S, Abe K and Kono T (2007) Identification of marker genes for intestinal immunomodulating effect of a fructooligosaccharide by DNA microarray analysis. *J Agric Food Chem* 55: 3174-3179.

Gardiner KR, Kirk SJ and Rowlands BJ (1995) Novel substrates to maintain gut integrity. *Nutr Res Rev* 8: 43-66.

Gelders GG, Bijmens L, Loosveld AM, Vidts A and Delcour JA (2003) Fractionation of starch hydrolysates into dextrans with narrow molecular mass distribution and their detection by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J Chromatogr A* 992: 75-83.

Gibson GR (1998) Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *Brit J Nutr* 80: 209-212.

Gibson GR (1999) Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J Nutr* 129: 1438.

Gibson GR, Probert HM, Van Loo JAE and Roberfroid MB (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 17: 259.

Gibson GR and Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125: 1401-1412.

Grant AL, Thomas JW, King KJ and Liesman JS (1990) Effects of dietary amines on small intestinal variables in neonatal pigs fed soy protein isolate. *J Anim Sci* 68: 363-371.

Grizar D and Barthomeuf C (1999) Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reprod Nutr Dev* 39: 563-588.

Gudiel-Urbano M and Goñi I. (2001) Human milk oligosaccharides. The rule in the health and development of the infants. *Arch Latinoam Nutr* 51: 332-339.

Harada E, Hashimoto Y and Syuto B (1994) Orally administered spermine induces precocious intestinal maturation of macromolecular transport and disaccharidase development in suckling rats. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 109: 667-673.

Hedemann MS, Eskildsen M, Laerke HN, Pedersen C, Lindberg JE, Laurinen P and Knudsen KEB (2006) Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting fiber concentrations and fiber properties. *J Anim Sci* 84: 1375.

Hidaka H, Eida T, Takizawa T, Tokunaga T and Tashiro Y (1986) Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobact Microflora* 5: 37-50.

Hidaka H, Tashiro Y and Eida T (1991) Proliferation of bifidobacteria by oligosaccharides and their useful effect on human health. *Bifidobact Microflora* 10: 65-79.

Hoet PHM and Nemery B (2000) Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L417-L433.

Hond ED, Geypens B and Ghooys Y (2000) Effect of high performance chicory inulin on constipation. *Nutr Res* 20: 731-736.

Howard MD, Gordon DT, Garleb KA and Kerley MS (1995) Dietary fructooligosaccharide, xylooligosaccharide and gum arabic have variable effects on cecal and colonic microbiota and epithelial cell proliferation in mice and rats. *J Nutr* 125: 2604-2609.

Howard M, Gordon D, Pace L, Garleb K and Kerley M (1995b) Effects of dietary supplementation with fructooligosaccharides on colonic microbiota populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs. *J Pediatr Gastr Nutr* 21: 297-303.

Hrboticky N, MacKinnon MJ, Puterman ML and Innis SM (1989) Effect of linoleic acid-rich infant formula feeding on brain synaptosomal lipid accretion and enzyme thermotropic behavior in the piglet. *J Lipid Res* 30: 1173-1184.

Jenkins DJA, Kendall CWC and Vuksan V (1999) Inulin, oligofructose and intestinal function. *J Nutr* 129: 1431.

Kabel MA, Schols HA and Voragen AGJ (2002) Complex xylo-oligosaccharides identified from hydrothermally treated *Eucalyptus* wood and brewery's spent grain. *Carbohydr Polym* 50: 191-200.

Kaouass M, Deloyer P and Dandrifosse G (1994) Intestinal development in suckling rats: direct or indirect spermine action? *Digestion* 55: 160-167.

Kaur N and Gupta AK (2002) Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci* 27: 703-714.

Kelly D, King TP, Brown DS and McFadyen M (1991) Polyamide profiles of porcine milk and of intestinal tissue of pigs during suckling. *Reprod Nutr Dev* 31: 73-80.

Kien CL, McClead RE and Cordero L Jr (1998) Effects of lactose intake on lactose digestion and colonic fermentation in preterm infants. *J Pediatr* 133: 401-405.

Kleessen B, Sykura B, Zunft HJ and Blaut M (1997) Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *Am J Clin Nutr* 65: 1397-1402.

Knol J, Scholtens P, Kafka C, Steenbakkens J, Gro S, Helm K, Klarczyk M, Schopfer H, Bockler HM and Wells J (2005) Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. *J Pediatr Gastr Nutr* 40: 36-42.

Kok N, Taper H and Delzenne N (1998) Oligofructose modulates lipid metabolism alterations induced by a fat-rich diet in rats. *J Appl Toxicol* 18: 47-53.

Koletzko B, Aggett PJ, Bindels JG, Bung P, Ferré P, Gil A, Lentze MJ, Roberfroid M and Strobel S (1998) Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *Br J Nutr* 80: S5-45.

Koo M and Rao AV (1991) Long-term effect of bifidobacteria and neosugar on precursor lesions of colonic cancer in CF1 mice. *Nutr Cancer* 16: 249-257.

Kulkarni N and Reddy BS (1994) Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial beta-glucuronidase. *Proc Soc Exp Biol Med* 207: 278-283.

Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N and Strobel S (2000) Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr* 20: 699-722.

Landenburg A (1886) Ueber pentamethylendiamin und tetramethylendiamin. *Ber deuts chemis Gesell* 19: 780-783.

Loret S, Brolet P, Pierzynowski S, Gouders I, Klimek M, Danielson V, Rosted A, Lesniewska V and Dandrifosse G (2000) Pancreatic exocrine secretions as a source of luminal polyamines in pigs. *Exp Physiol* 85: 301-308.

Lortie MJ, Novotny WF, Peterson OW, Vallon V, Malvey K, Mendonca M, Satriano J, Insel P, Thomson SC and Blantz RC (1996) Agmatine, a bioactive metabolite of arginine. Production, degradation, and functional effects in the kidney of the rat. *J Clin Invest* 97: 413-420.

Loser C, Eisel A, Harms D and Folsch UR (1999) Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut* 44: 12-16.

MacFaddin JF (1976) Biochemical tests for identification of medical bacteria. pp 52-63.

Macfarlane GT and Macfarlane S (1997) Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand J Gastroenterol Suppl* 222: 3-9.

Madsen KL, Brockway PD, Johnson LR, Hardin JA and Gall DG (1996) Role of ornithine decarboxylase in enterocyte mitochondrial function and integrity. *Am J Physiol-Gastr L* 270: G789-G797.

Manners MJ (1976) The development of digestive function in the pig. *Proc Nutr Soc* 35: 49.

Gómez-Gómez M, Danglot-Banck C and Vega-Franco L (2007) Intolerancia transitoria a lactosa: criterios y procedimientos de diagnóstico. *Rev Mex Pediatr* 74: 24-31.

Hernández Rodríguez M (2001) Alimentación infantil. 3rd Ed. Diaz de Santos. Madrid Pg 50.

Marion J, Petersen YM, Rome´ V, Thomas F, Sangild PT, Dividich JL and Le Hue´rou-Luron I (2005) Early weaning stimulates intestinal brush border enzyme activities in piglets, mainly at the posttranscriptional level. *J Pediatr Gastr Nutr* 41: 401-410.

Marton LJ and Pegg AE (1995) Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu Rev Pharmacol* 35: 55-91.

Mayeur C, Veuillet G, Michaud M, Raul F, Blottiere HM and Blachier F (2005) Effects of agmatine accumulation in human colon carcinoma cells on polyamine metabolism, DNA synthesis and the cell cycle. *BBA-Molecular Cell Research* 1745: 111-123.

McCormack SA and Johnson LR (1991) Role of polyamines in gastrointestinal mucosal growth. *Am J Physiol Gastr L* 260: G795-G806.

McVeagh P and Miller JB (1997) Human milk oligosaccharides: only the breast. *J Paediatr Child Health* 33: 281-286.

Méndez JD, Méndez V, Gómez L and Arana V (2003) Las poliaminas, pequeñas grandes moléculas. *Rev Mex Seg Soc* 51: 31-44.

Miller ER and Ullrey DE (1987) The Pig as a model for human nutrition. *Annu Rev Nutr* 7: 361-382.

Miller JB, Bull S, Miller J and McVeagh P (1994) The oligosaccharide composition of human milk: temporal and individual variations in monosaccharide components. *J Pediatr Gastr Nutr* 19: 371-376.

Miller TL and Wolin MJ (1996) Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Appl Environ Microbiol* 62: 1589-1592.

Milovic V, Odera G, Murphy GM and Dowling RH (1997) Jejunal putrescine absorption and the pharmacokinetics/biotransformation of ingested putrescine in humans. *Gut* 41: A62.

Milovic V (2001) Polyamines in the gut lumen: bioavailability and biodistribution. *Eur J Gastroen Hepat* 13: 1021-1025.

Milovic V, Deubner C, Zeuzem S, Piiper A, Caspary WF and Stein J (1995) EGF Stimulates Polyamine Uptake in Caco-2 Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 962-968.

Moinard C, Cynober L and de Bandt JP (2005) Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr* 24: 184-197.

Moro G, Minoli I, Mosca M, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B and Boehm G (2002) Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *J Pediatr Gastr Nutr* 34: 291-295.

Moro G, Arslanoglu S, Stahl B, Jelinek J, Wahn U and Boehm G (2006) A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Arch Dis Child* 91: 814-819.

Motyl T, Ploszaj T, Wojtasik A, Kukulska W and Podgurniak M (1995) Polyamines in cow's and sow's milk. *Comp Biochem Physiol* 111B: 427-433.

Mou S, Sun Q and Lu D (1991) Determination of xylose oligomers and monosaccharides by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J Chromatogr* 546: 289-295.

Murphy O (2001) Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. *Brit J Nutr* 1: 53.

Mussatto SI and Mancilha IM (2007) Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr Polym* 68: 597.

Mutter M, Renard C, Beldmand G, Schols HA and Voragen AGJ (1998) Mode of action of RG-hydrolase and RG-lyase toward rhamnogalacturonan oligomers. Characterization of degradation products using RG-rhamnohydrolase and RG-galacturonohydrolase. *Carbohydr Res* 311: 155-164.

National Research Council (1998) Nutrient requirements of swine.

Newburg DS (1997) Do the binding properties of oligosaccharides in milk protect human infants from gastrointestinal bacteria? *J Nutr* 127: 980S.

Noack J, Kleessen B, Proll J, Dongowski G and Blaut M (1998) Dietary guar gum and pectin stimulate intestinal microbial polyamine synthesis in rats. *J Nutrition* 128: 1385-1391.

Noack J, Dongowski G, Hartmann L and Blaut M (2000) The human gut bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Fusobacterium varium* produce putrescine and spermidine in cecum of pectin-fed gnotobiotic rats. *J Nutr* 130: 1225-1231.

Ohta A, Ohtsuki M, Baba S, Adachi T, Sakata T and Sakaguchi E (1995) Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. *J Nutr* 125: 2417-2424.

Okamoto A, Sugi E, Koizumi Y, Yanagida F and Udaka S (1997) Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 1582-1584.

Oku T. (1996) Oligosaccharides with beneficial health effects: a Japanese perspective. *Nutr Rev* 45: 56-59.

Olle H (1986) Putrescine, Spermidine, and Spermine. *News Physiol Sci* 1: 12-15.

Ono K (1975) The fine structure and localization of alkaline phosphatase activity of the small intestinal epithelium in the postnatal developing rat. *Acta Histochem* 52: 117-133.

Orrhage K and Nord CE (1999) Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr* 430: 47-57.

Osborne DL and Seidel ER (1990) Gastrointestinal luminal polyamines: cellular accumulation and enterohepatic circulation. *Am J Physiol-Gastr L* 258: G576-G584.

Pegg AE and McCann PP (1982) Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol-Cell Ph* 243: C212-C221.

Peulen O, Deloyer P and Dandrifosse G (2004) Short-term effects of spermine ingestion on the small intestine: a comparison of suckling and weaned rats. *Reprod Nutr Dev* 44: 364.

Peulen O, Pirlet C, Klimek M, Goffinet G and Dandrifosse G (1998) Comparison between the natural postnatal maturation and the spermine-induced maturation of the rat intestine. *Arch Physiol Biochem* 106: 46-55.

Peulen O, Gharbi M, Powroznik B and Dandrifosse G (2004) Differential effect of dietary spermine on alkaline phosphatase activity in jejunum and ileum of unweaned rats. *Biochimie* 86: 487-493.

Pollack PF, Koldovsky O and Nishioka K (1992) Polyamine in human and rat milk and in infant formulas. *Am J Clin Nutr* 56: 371-375.

Reddy BS (1999) Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor Growth. *J Nutr* 129: 1478.

Reis DJ and Regunathan S (2000) Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol Sci* 21: 187-193.

Rivero-Urgell M and Santamaria-Orleans A (2001) Oligosaccharides: application in infant food. *Early Hum Dev* 65: S43-S52.

Rivero Urgell M, Santamaría Orleans A and Rodriguez-Palmero Seuma M (2005) La importancia de los ingredientes funcionales en las leches y cereales infantiles. *Nutr Hosp* 20: 135-146.

Roberfroid MB (2000) Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal tract. *Nutrition* 16: 677-679.

Roberfroid MB and Delzenne NM (1998) Dietary fructans. *Annu Rev Nutr* 18: 117-143.

Rogers P and Staruszkiewicz W (1997) Gas chromatographic method for putrescine and cadaverine in canned tuna and mahimahi and fluorometric method for histamine (minor modification of AOAC official method 977.13): Collaborative study. *J AOAC Int* 80: 591-600.

Romain N, Dandrifosse G, Jeusette F and Forget P-P (1992) Polyamine concentration in rat milk and food, human milk, and infant formulas. *Pediatr Res* 32: 58-63.

Roon RJ and Barker HA (1972) Fermentation of agmatine in *Streptococcus faecalis*: occurrence of putrescine transcarbamoylase. *J Bacteriol* 109: 44-50.

Rosalki SB, Foo AY, Burlina A, Prellwitz W, Stieber P, Neumeier D, Klein G, Poppe WA and Bodenmuller H (1993) Multicenter evaluation of Iso-ALP test kit for measurement of bone alkaline phosphatase activity in serum and plasma. *Clin Chem* 39: 648-652.

Rosenheim O (1924) The isolation of spermine phosphate from semen and testis. *Biochem J* 18: 1253-1262.

Russell DH and McVicker TA (1972) Polyamine biogenesis in the rat mammary gland during pregnancy and lactation. *Biochem J* 130: 71-76.

Sabharwal H, Sjöblad S and Lundblad A (1991) Affinity chromatographic identification and quantitation of blood group A-active oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed infants. *J Pediatr Gastr Nutr* 12: 474-479.

Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M and Rowland I (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit J Nutr* 80: 147-171.

Satriano J, Matsufuji S, Murakami Y, Lortie MJ, Schwartz D, Kelly CJ, Hayashi Si and Blantz RC (1998) Agmatine suppresses proliferation by frameshift induction of antizyme and attenuation of cellular polyamine levels. *J Biol Chem* 273: 15313-15316.

Sánchez de Medina F, Sánchez Pozo A and Suárez MD (1993) Introducción a la bioquímica clínica. *ICE* 24: 273.

Schipper RG, Penning LC and Verhofstad AA. (2000) Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? *Semin Cancer Biol* 10: 55-68.

Scholz-Ahrens K, Schaafsma G, Van der Heuvel E and Schrezenmeir J (2001) Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am J Clin Nutr* 73: 459S-464S.

Schreiner Ph (1878) Über eine neue organische Basis in thierischen Organismen. *Justus Liebig's Annalen der Chemie* 194: 68-84.

Seiler N (1983) Liquid chromatographic methods for assaying polyamines using prechromatographic derivatization. *Method Enzymol* 94: 10-25.

Seiler N (1986) Polyamines. *J Chromatogra* 1986: 157-176.

Shigesawa A, Onoda N, Chung YS, Yano Y, Otani S, Fukushima S and Sowa M (1998) Elevation in putrescine level and spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity coincide with tumor development in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon. *Oncol Rep* 5: 125-129.

Shulman RJ, Henning SJ and Nichols BL (1988) The miniature pig as an animal model for the study of intestinal enzyme development. *Pediatr Res* 23: 311-315.

Shulman RJ (1993) The piglet can be used to study the effects of parenteral and enteral nutrition on body composition. *J Nutr* 123: 395-398.

Simon JP SV (1982) Enzymes of agmatine degradation and the control of their synthesis in *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 152: 676-681.

Slotkin TA, Ferguson SA, Cada AM, McCook EC and Seidler FJ (2000) Neonatal polyamine depletion by [alpha]-difluoromethylornithine: effects on adenylyl cyclase cell signaling are separable from effects on brain region growth. *Brain Res* 887: 16-22.

Sun D, Wollin A and Stephen AM (2002) Moderate folate deficiency influences polyamine synthesis in rats. *J Nutr* 132: 2632-2637.

Swennen K, ourtin KM and elcour JA (2006) Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Crit Rev Food Sci* 46: 471.

Szasz G (1974) *Methods of enzymatic analysis*. 2nd English ed New York: Academic Press Inc. Vol. 217.

Tabor CW and Tabor H (1985) Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev* 49: 81-99.

Teixeira D, Santaolaria ML, Meneu V and Alonso E (2002) Dietary arginine slightly and variably affects tissue polyamine levels in male swiss albino mice. *J Nutr* 132: 3715-3720.

Ter Steege JCA, Buurman WA and Forget PP (1997) Spermine induces maturation of the immature intestinal immune system in neonatal mice. *J Pediatr Gastr Nutr* 25: 332-340.

Thomas T and Thomas TJ. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci (CMLS)* 58: 244-258.

Tomomatsu H (1994) Health effects of oligosaccharides. *Food Technol-Chicago* 48: 65.

Trowell H. (1976) Definition of dietary fiber and hypotheses that it is a protective factor in certain diseases. *Am J Clin Nutr* 29: 417-427.

Tungland BC (2008) Fructooligosaccharides and other fructans: structures and occurrence, production, regulatory aspects, food applications and nutritional health significance. In: Eggleston G and Côté GL (eds) *Oligosaccharides in food & agriculture*, ACS Press, Washington DC.

Urdiales JL, Medina MA and Sanchez-Jimenez F (2006) Polyamine metabolism revisited. *Eur J Gastroen Hepat* 13: 1015-1019.

Van Dijk AJ, Niewold TA, Margry RJCF, Van Den Hoven SGC, Nabuurs MJA, Stockhofe-Zurwieden N and Beynen AC (2001) Small intestinal morphology in weaned piglets fed a diet containing spray-dried porcine plasma. *Res Vet Sci* 71: 17-22.

Van Eijk H, Rooyackers D and Deutz N (1996) Automated determination of polyamines by high-performance liquid chromatography with simple sample preparation. *J Chromatogr A* 730: 115-120.

Van Leuwenhoek A. (1678) *Observationes D Anthonii Leuwenhoek de natis semine genitali animalcules*. *Philos Trans R Soc Lond* 12: 1040-1043.

Vauquelin LN (1791) Expériences sur le sperme humain. *Ann Chim* 9: 64-80.

Wang W, Liu LQ and Higuchi CM (1996) Mucosal polyamine measurements and colorectal cancer risk. *J Cell Biochem* 63: 252-257.

Wang X and Gibson GR (1993) Effects of the in vitro fermentation of oligofructosa and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol* 75: 373-380.

Wargovich MJ, Chen CD, Jimenez A, Steele VE, Velasco M, Stephens LC, Price R, Gray K and Kelloff GJ (1996) Aberrant crypts as a biomarker for colon cancer: evaluation of potential chemopreventive agents in the rat. *Cancer Epidem Biomar* 5: 355-360.

Wargowich MJ, Eng VWS and Newmark H (1984) Ca inhibits the damaging and compensatory proliferating effect of fatty acids on mouse colon epithelium. *Cancer Lett* 23: 253-258.

Weiger TM, Langer T and Hermann A (1998) External action of di- and polyamines on maxi calcium-activated potassium channels: An electrophysiological and molecular modeling study. *Biophys J* 74: 722-730.

White CA, Corran PH and Kennedy JF (1980) Analysis of underivatized D-gluco-oligosaccharides (d.p. 2-20) by high-pressure liquid chromatography. *Carbohydr Res* 87: 165-173.

Widdowson EM (1985) Development of the digestive system: comparative animal studies. *Am J Clin Nutr* 41: 384-390.

Wild GE, Daly AS, Sauriol N and Bennett G (1993) Effect of exogenously administered polyamine on the structural maturation and enzyme ontogeny of the postnatal rat intestine. *Biol Neonate* 63: 246-257.

Yoshioka Iseki K and Fujita K (1983) Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infant. *Pediatrics* 72: 317-332.

Yuan Q, Ray RM, Viar MJ and Johnson LR (2001) Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol-Gastr L* 280: G130-G138.

Yun JW (1996) Fructooligosaccharides-occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microb Tech* 19: 107-117.



## LISTA DE TABLAS

---

<b>Tabla 1</b>	Efectos biológicos de las poliaminas	<b>23</b>
<b>Tabla 2</b>	Contenido en poliaminas en frutas, verduras y otros alimentos	<b>30</b>
<b>Tabla 3</b>	Concentraciones de poliaminas en leche materna humana	<b>32</b>
<b>Tabla 4</b>	Oligosacáridos bifidogénicos para industria alimentaria	<b>39</b>
<b>Tabla 5</b>	Propiedades funcionales de los azúcares no digeribles	<b>45</b>
<b>Tabla 6</b>	Porcentaje de inulina por peso fresco de algunos alimentos	<b>48</b>
<b>Tabla 7</b>	Descripción de alimentos con las aplicaciones de inulina y oligofruktosa	<b>49</b>
<b>Tabla 8</b>	Efectos de la ingesta de fructooligosacáridos sobre la microbiota intestinal humana	<b>51</b>
<b>Tabla 9</b>	Composición de macronutrientes de distintas dietas para lechones	<b>68</b>
<b>Tabla 10</b>	Contenido en poliaminas de la leche de cerda durante las dos primeras semanas de lactancia	<b>69</b>
<b>Tabla 11</b>	Composición de nutrientes de la fórmula láctea diseñada para lechones	<b>70</b>
<b>Tabla 12</b>	Composición en ácidos grasos de la fórmula láctea diseñada para lechones	<b>71</b>
<b>Tabla 13</b>	Medios de cultivo, tiempo y condiciones de incubación para cada grupo de microorganismo estudiado	<b>81</b>
<b>Tabla 14</b>	Ingesta total de fórmula reconstituida en los distintos grupos de animales	<b>95</b>

<b>Tabla 15</b>	Conductividad y pH del contenido cecal de los cerdos alimentados con las distintas dietas	<b>96</b>
<b>Tabla 16</b>	Actividades de las enzimas disacaridasas en la mucosa de yeyuno	<b>105</b>
<b>Tabla 17</b>	Estadísticos descriptivos del recuento de anaerobios en medio Wilkins	<b>109</b>
<b>Tabla 18</b>	Estadísticos descriptivos del recuento de esporas de clostridios en medio agar reforzado para clostridios	<b>111</b>
<b>Tabla 19</b>	Estadísticos descriptivos del recuento de bifidobacterias en medio Berens	<b>112</b>
<b>Tabla 20</b>	Estadísticos descriptivos del recuento de lactobacilos en medio Rogosa	<b>114</b>
<b>Tabla 21</b>	Estadísticos descriptivos del recuento de viables en medio MacConkey	<b>115</b>
<b>Tabla 22</b>	Estadísticos descriptivos del recuento de aerobios en medio Columbia	<b>116</b>
<b>Tabla 23</b>	Estadísticos descriptivos del recuento de anaerobios en medio agar de Sabouraud suplementado con cloranfenicol	<b>118</b>
<b>Tabla 24</b>	Resultados de las pruebas bioquímicas de los kits API CHL 50 realizadas a las distintas cepas microbianas aisladas del contenido cecal de los animales	<b>126</b>
<b>Tabla 25</b>	Resultados de las pruebas bioquímicas de los kits API 20A realizadas a las distintas cepas microbianas aisladas del contenido cecal de los animales	<b>128</b>

<b>Tabla 26</b>	Concentración de poliaminas producidas por microorganismos del contenido cecal de cerdos neonatales alimentados con la formula control y la formula suplementada con FOS, cultivados en medio Falkow y medio Falkow suplementado con ornitina (0,5% w/v)	<b>131</b>
<b>Tabla 27</b>	Concentración de poliaminas producidas por microorganismos del contenido cecal de los cerdos alimentados con la formula control y la formula suplementada con FOS, cultivados en medio Falkow y medio Falkow suplementado con ornitina (0,5% w/v)	<b>133</b>
<b>Tabla 28</b>	Concentración de poliaminas en leche de cerda y leche humana	<b>143</b>

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b>	Sistema de descarboxilación de la arginina	<b>10</b>
<b>Figura 2</b>	Representación 3D de las poliaminas	<b>12</b>
<b>Figura 3</b>	Síntesis e interconversión de poliaminas	<b>15</b>
<b>Figura 4</b>	Sistema arginina dehidrolasa	<b>16</b>
<b>Figura 5</b>	Absorción y pool intracelular de poliaminas en los enterocitos	<b>18</b>
<b>Figura 6</b>	Ciclo de la urea	<b>20</b>
<b>Figura 7</b>	Síntesis de homocisteína	<b>21</b>
<b>Figura 8</b>	Ejemplos de modos de unión preferencial entre las poliaminas y el DNA	<b>28</b>
<b>Figura 9</b>	Estructura química de los fructooligosacáridos	<b>41</b>
<b>Figura 10</b>	Estructura química de fructooligosacáridos de cadena corta	<b>42</b>
<b>Figura 11</b>	Representación esquemática de los procesos de producción de los fructooligosacáridos	<b>43</b>
<b>Figura 12</b>	Lechones en las parideras alimentados con leche materna	<b>67</b>
<b>Figura 13</b>	Alimentación de los lechones estabulados en incubadoras	<b>68</b>
<b>Figura 14</b>	Disección y recogida de muestras	<b>72</b>
<b>Figura 15</b>	Recogida de muestras del intestino de los lechones	<b>72</b>
<b>Figura 16</b>	Secciones transversales de intestino delgado y ciego de lechones a los 15 días de vida	<b>74</b>
<b>Figura 17</b>	Galerías API CHL 50 y API 20A	<b>82</b>

<b>Figura 18</b>	Peso de los grupos de animales alimentados con distintas dietas	<b>93</b>
<b>Figura 19</b>	Peso final de cada grupo de animales alimentado con dietas diferentes	<b>94</b>
<b>Figura 20</b>	Ingestas diarias por 100 g ramos de peso inicial de los distintos grupos de animales alimentados con las fórmulas	<b>95</b>
<b>Figura 21</b>	Profundidad de las criptas intestinales en los grupos de animales alimentados con las distintas dietas	<b>97</b>
<b>Figura 22</b>	Profundidad de las criptas intestinales de cada sección de intestino delgado en los grupos de animales alimentados con las distintas dietas	<b>98</b>
<b>Figura 23</b>	Longitud de las vellosidades intestinales de los grupos de animales alimentados con las distintas dietas	<b>99</b>
<b>Figura 24</b>	Longitud de las vellosidades intestinales de cada sección de intestino delgado de los grupos de animales alimentados con las distintas dietas	<b>99</b>
<b>Figura 25</b>	Correlación entre la medida de la profundidad de las criptas y la longitud de las vellosidades intestinales de yeyuno en los animales alimentados con diferentes dietas	<b>100</b>
<b>Figura 26</b>	Correlación entre el n <sup>o</sup> céls/vell. y la longitud de las vellosidades intestinales de yeyuno en los animales del grupo control y el grupo alimentado con poliaminas	<b>101</b>
<b>Figura 27</b>	Actividad de la enzima fosfatasa alcalina en la mucosa de yeyuno de los grupos de animales alimentados con distintas dietas	<b>102</b>
<b>Figura 28</b>	Actividad de la enzima $\gamma$ -glutamil transferasa en la mucosa de yeyuno de los grupos de animales alimentados con distintas dietas	<b>102</b>

<b>Figura 29</b>	Correlación entre el n°céls/vell. y la actividad fosfatasa alcalina de la mucosa de yeyuno en los animales del grupo control y el grupo alimentado con poliaminas	<b>103</b>
<b>Figura 30</b>	Correlación entre el n°céls/vell. y la actividad $\gamma$ -glutamyl transferasa de la mucosa de yeyuno en los animales del grupo control y el grupo alimentado con poliaminas	<b>104</b>
<b>Figura 31</b>	Concentración media de poliaminas putrescina, espermidina y espermina de la mucosa de yeyuno e íleon de los grupos de animales alimentados con las distintas dietas	<b>106</b>
<b>Figura 32</b>	Recuento de microorganismos anaerobios estrictos y facultativos en medio Wilkins	<b>109</b>
<b>Figura 33</b>	Recuento de esporas de clostridios en medio agar reforzado para clostridios	<b>110</b>
<b>Figura 34</b>	Recuento de bifidobacterias en medio Berens	<b>112</b>
<b>Figura 35</b>	Recuento selectivo de lactobacilos en medio agar Rogosa	<b>113</b>
<b>Figura 36</b>	Recuento de viables en medio MacConkey	<b>115</b>
<b>Figura 37</b>	Recuento de microorganismos aerobios + anaerobios facultativos + anaerobios aerotolerantes en medio Columbia	<b>116</b>
<b>Figura 38</b>	Recuento de hongos y levaduras en medio agar de Sabouraud	<b>117</b>
<b>Figura 39</b>	Profundidad de las criptas del ciego en los grupos de animales alimentados con las distintas dietas	<b>119</b>
<b>Figura 40</b>	Actividad de la enzima fosfatasa alcalina en la mucosa de ciego de los grupos de animales alimentados con distintas dietas	<b>120</b>

<b>Figura 41</b>	Actividad de la enzima $\gamma$ -glutamyl transferasa en la mucosa de ciego de los grupos de animales alimentados con distintas dietas	<b>120</b>
<b>Figura 42</b>	Correlaciones entre la profundidad de las criptas de ciego y la actividad fosfatasa alcalina (A) y $\gamma$ -GT (B) de mucosa de ciego	<b>121</b>
<b>Figura 43</b>	Concentración media de poliaminas, putrescina, espermidina, espermina y poliaminas totales del contenido cecal de los animales alimentados con distintas dietas	<b>122</b>
<b>Figura 44</b>	Concentración media de poliaminas, putrescina, espermidina, espermina y poliaminas totales de la mucosa de ciego de los grupos de animales alimentados con distintas dietas	<b>124</b>
<b>Figura 45</b>	Tinción de Gram de bacterias del contenido cecal y cepas aisladas en medio Berens y Rogosa	<b>129</b>
<b>Figura 46</b>	Incremento en la producción de poliaminas de las cepas bacterianas seleccionadas por los FOS incubadas en medio Falkow suplementado con ornitina respecto al medio Falkow sin suplementar	<b>130</b>
<b>Figura 47</b>	Esquema de la realización del estudio dosis dependiente	<b>132</b>
<b>Figura 48</b>	Concentración de poliaminas, putrescina, espermidina, espermina y poliaminas totales producidas por los microorganismos del contenido cecal de los cerdos alimentados con la formula control y con la fórmula suplementada con FOS cultivados en medio Falkow suplementado con diferentes concentraciones de FOS	<b>134</b>
<b>Figura 49</b>	Concentración de poliaminas, putrescina, espermidina, espermina y poliaminas totales producidas por los microorganismos del contenido cecal de los cerdos alimentados con la formula control y con la fórmula suplementada con FOS cultivados en medio Falkow suplementado con ornitina y diferentes concentraciones de FOS	<b>136</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

---

ADC	Arginina descarboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
C10:0	Ácido cáprico
C12:0	Ácido láurico o dodecanoico
C14:0	Ácido mirístico o tetradecanoico
C16:0	Ácido palmítico o hexadecanoico
C16:1	Ácido palmitoleico
C18:0	Ácido esteárico u octadecanoico
C18:1	Ácido oleico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3	Ácido linolénico
C20:0	Ácido eicosanoico
C4:0	Ácido butírico
C6:0	Ácido caproico
C8:0	Ácido caprílico
CFU	Unidades formadoras de colonias
DAO	Diamino oxidasa
DFMO	Difluorometilornitina
ESPGAN	Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica
F	Fructosa
FA	Fosfatasa alcalina
FCE	Factor de crecimiento epidérmico
FOS	Fructooligosacáridos
G	Glucosa
GABA	Ácido $\gamma$ -amino-butírico
GOS	Galactooligosacáridos
HPAEC	Cromatográfica de intercambio aniónico de alto rendimiento

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IFN	Interferon
IgA	Inmunoglobulina A
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MS	Espectrometría de masas
NDOs	Oligosacáridos no digeribles
NMR	Resonancia magnética nuclear
NO	Óxido nítrico
ODC	Ornitina descarboxilasa
OPA	Orto-oftaldehído
PAD	Detección amperimétrica pulsada
PAO	Poli-amino oxidasa
PBS	Tampón fosfato salino
SAM	S-adenosil metionina
SAM-DC	SAM descarboxilasa
SAM-HC	SAM descarboxilada
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta
scFOS	Fructooligosacáridos de cadena corta
TLC	Cromatografía de capa fina
UMA	Unidad de masa atómica
$\gamma$ -GT	Gamma glutamil transferasa