

Investigación de propiedades prebióticas de alimentos o componentes alimenticios

Investigating food or food components' prebiotic properties

Sarmiento Rubiano L. A

Bacterióloga, PhD. www.lusarru@iata.csic.es.
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC. Valencia-España

Recibido: Septiembre 11 de 2008. Aceptado: Noviembre 11 de 2008

RESUMEN

Cada día son más los estudios que revelan los potenciales usos y ventajas fisiológicas de los prebióticos, ingredientes alimenticios no digeribles, que tiene el potencial de mejorar la salud del huésped, por estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon. Los prebióticos pertenecen al grupo de los alimentos funcionales, aquellos que aportan efectos beneficiosos para la salud adicionales a la nutrición básica. En este documento se resumen algunos de los más importantes efectos beneficiosos para la salud de los prebióticos, así como las técnicas y procedimientos que han sido utilizados para la verificación científica de dichas propiedades. El objetivo, es generar en los jóvenes investigadores Colombianos la iniciativa para emprender proyectos de investigación de nuevos alimentos o componentes alimenticios con propiedades prebióticas, propios de la región.

SUMMARY

Every day further studies are revealing prebiotics' potential uses and physiological advantages; these are non-digestible food ingredients able to improve a host's health by selectively stimulating the growth and/or activity of one or a limited number of bacteria in the colon. Prebiotics belong to the functional food group providing beneficial effects for health in addition to those of basic nutrition. This document summarises some of the most important beneficial effects for health derived from prebiotics, as well as the techniques and procedures which have been used for scientifically verifying such properties. The aim is to stimulate young Colombian researchers to take the initiative for undertaking research projects into new food or food components from the region having prebiotic properties.

INTRODUCCIÓN

Actualmente las tendencias de consumo de alimentos en los países desarrollados y en muchos de los países en desarrollo, están orientadas a la adquisición de alimentos cuyo consumo genera beneficios adicionales a la nutrición básica, tal es el caso de los llamados alimentos funcionales, considerados como aquellos que, además de hacer un aporte nutricional, ejercen efectos beneficiosos sobre una o más funciones del organismo, fomentando la salud y/o reduciendo el riesgo de enfermedad. El creciente interés en el tema de los alimentos funcionales, justifica que las autoridades de los diferentes países, establezcan políticas regulatorias en relación a los alimentos funcionales y las respectivas alegaciones en salud. En 1991 se establece en Japón el concepto de alimentos para uso específico en la salud "FOSHU" (Foods for Specified Health Use), los alimentos que se incluyen dentro de la categoría FOSHU deben estar autorizados por el ministerio de salud, previa presentación de la evidencia científica de que su consumo dentro de una dieta normal, genera beneficios para la salud (Saito, 2007). En los Estados Unidos de América la Administración para Alimentos y Medicamentos (FDA), permite desde 1993 alegaciones de salud en ciertos alimentos, siempre que existan evidencias científicas suficientes que las respalden y que estén autorizadas por organismos científicos federales como los Institutos Nacionales de Salud, o los Centros para la Prevención y Control de Enfermedades (Ross, 2000). La Comisión Europea regulará a partir del año 2010 la comercialización y el consumo de los alimentos funcionales, mediante el Reglamento (CE) Nº 1924/2006, relativo a las declaraciones nutricionales y propiedades saludables en los alimentos. Debe quedar demostradas la cantidad de alimento y las pautas de consumo requeridos para obtener el efecto declarado. Solamente se autorizara el uso de declaraciones nutricionales y de propiedades saludables, si se cumplen las siguientes condiciones respecto al componente funcional: (i) que se haya demostrado científicamente el efecto beneficioso; (ii) que esté en el producto final en cantidad suficiente y en una forma asimilable por el organismo; (iii) que la cantidad que se consuma razonablemente proporcione una cantidad significativa

de la sustancia activa; y (iv) que el consumidor medio comprenda los efectos beneficiosos que se expresan en la declaración. En este Artículo de revisión, se resumen algunos de los más importantes efectos beneficiosos para la salud de los prebióticos, así como las técnicas y procedimientos que han sido utilizados para la verificación científica de dichas propiedades.

EFFECTO BENEFICIOSO DE LOS PREBIÓTICOS

Dentro del amplio contexto de los alimentos funcionales, los prebióticos han sido intensamente estudiados, debido a la diversidad y magnitud de efectos beneficiosos que en la salud, genera su consumo. Prebiótico es un ingrediente alimenticio no digerible, que tiene el potencial de mejorar la salud del huésped, por estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon (Gibson et al., 2004). Las dianas convencionales para los prebióticos son especies que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Rastall et al., 2005). La inulina y los fructooligosacáridos (FOS) han sido los prebióticos más estudiados, por su gran resistencia a ser digeridos por los ácidos gástricos y enzimas pancreáticas, llegando al colon para ser fermentados por las bacterias intestinales. Estos prebióticos afectan significativamente la composición de la microbiota intestinal, reducen la incidencia de infecciones gastrointestinales, respiratorias y de la dermatitis atópica, tienen además un reconocido efecto bifidogénico (Aumento de la población de bifidobacterias en el colon) (Kolida and Gibson, 2007; Veereman, 2007; Guamer, 2007; Arslanoglu et al., 2007). Sin embargo, existe otra gran variedad de candidatos tales como algunos almidones no digeribles, polisacáridos no almidones y azúcares alcoholes o polioles, capaces de modificar beneficiosamente la microbiota del colon (Cummings et al., 2001; Wong and Jenkins, 2007). De los polioles, por ejemplo, los estudios revelan potenciales usos y ventajas fisiológicas como: mínimo aumento de los niveles de glucosa e insulina en sangre, modificación de la lipidemia disminuyendo el riesgo de enfermedad coronaria, baja acidificación oral ayudando a la

prevención de la caries dental, bajo valor energético, sensación de saciedad, generación de butirato y acidificación del colon entre otras (Livesey, 2001). Se ha comprobado que el consumo continuo de xilitol reduce de manera importante el riesgo de caries dental (Hujoel et al., 1999), y que previene la otitis media aguda en niños que lo consumen incorporado en goma de mascar, al inhibir el crecimiento y la adherencia en la mucosa nasofaringea del Neumococo y de *Haemophilus influenzae* (Uhari et al., 1996; Uhari et al., 1998). En ratas alimentadas con xilitol y sorbitol se ha observado un aumento significativo de calcio en los huesos (Knuutila et al., 1989). Se ha demostrado también, la actividad antioxidante en alimentos de algunos polioles como el sorbitol y manitol cuando son incorporados por ejemplo en una emulsión de aceite de pescado (Faraji and Lindsay, 2004). En general, los aspectos fisiológicos más estudiados, en los que se ha observado un cambio favorable relacionado con el consumo de prebióticos son:

(i) Aumento en la producción de ácidos orgánicos y prevención del cáncer de colon.

Los cambios cualitativos y/o cuantitativos de las especies bacterianas o de los sustratos disponibles en el ecosistema intestinal que se derivan del consumo de prebióticos, generan a su vez cambios en la producción final de metabolitos en el intestino. Los ácidos orgánicos son el principal producto final de las reacciones de fermentación en el colon; acetato, propionato y butirato se producen en mayores proporciones que lactato, succinato, valerato y malato entre otros. El acetato y el propionato son adsorbidos y llegan al hígado a través de la vena porta. El acetato en el hepatocito se incorpora al proceso de lipogénesis y colesterogénesis, mientras que el propionato actúa como inhibidor competitivo impidiendo la entrada del acetato a la célula hepática. El butirato, permanece en la luz intestinal siendo una importante fuente energética para las células del epitelio intestinal, regulando el crecimiento y diferenciación del colonocito (Salminen et al., 1998; Kien et al., 2007). Se ha demostrado que después de alimentar ratas con FOS durante 44 días, se logra una producción constante de butirato con efecto proliferativo de mucosa intestinal sana, estimulación de la actividad inmune y protección contra el cáncer de colon (Perrin et al.,

2001). El consumo de fibras no digeribles durante 14 días, logró una modificación en la microbiota intestinal de ratas y un aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta (Campbell et al., 1997). En ratas tratadas con azoximetano y ácido deoxicólico para inducir carcinogénesis, la continua ingestión de gluconato de sodio que aumenta la concentración luminal de butirato, reduce la incidencia de desarrollo del tumor y la generación de cáncer de colon (Kameue et al., 2004). La proliferación y diferenciación de células de la mucosa intestinal, se ha asociado con una disminución significativa del riesgo de cáncer de colon (Brady et al., 2000; Hughes and Rowland, 2001; Le Leu et al., 2002). Experimentos *in vitro*, realizados con el contenido intestinal de cerdos que habían consumido sorbitol, demostraron un aumento notable de la producción de ácidos grasos de cadena corta, principalmente butirato (Kiriya, et al., 1992). *In vivo* se demostró el aumento en la producción de butirato en muestras de ciego de ratas alimentadas con sorbitol (Sarmiento-Rubiano et al., 2007)

Existe controversia acerca de la influencia del butirato en la prevención del cáncer de colon y no se conocen plenamente los mecanismos por los cuales podría darse tal efecto, sin embargo se presume que la dosis y el tiempo de administración juegan un papel importante en la influencia del butirato para inhibir el desarrollo y la proliferación de las células cancerígenas (Lupton, 2004). Sin embargo se ha demostrado que el butirato promueve la remoción de células intestinales dañadas, mediante la estimulación de un regulado proceso de apoptosis (Bauer-Marinovic et al., 2006; Hughes and Rowland, 2001; Kien et al., 2007)

(ii) Disminución del colesterol sérico.

Los prebióticos son capaces de regular la lipidemia y trigliceridemia en humanos y animales por mecanismos aún no bien esclarecidos (Delzenne and Kok, 2001). En pacientes hipercolesterolémicos, la administración de 7g/día de inulina durante cuatro semanas redujo significativamente los niveles de colesterol total, colesterol de alta densidad LDL y triglicéridos (Balcazar-Muñoz et al., 2003). La disminución en los niveles de colesterol sanguíneo, por el consumo de prebióticos, se ha relacionado con la producción de ácidos grasos de cadena corta,

principalmente el propionato, (Pereira and Gibson, 2002). Los niveles de acetato y propionato juegan un papel importante en la síntesis hepática de colesterol, así se ha demostrado que el acetato aumenta la síntesis de colesterol, mientras que el propionato inhibe su producción (Wong *et al.*, 2006). Por esta razón algunos autores consideran que el consumo de prebióticos que logran reducir la proporción acetato/propionato pueden reducir los niveles séricos de colesterol. Un segundo mecanismo de reducción del colesterol por el consumo de prebióticos, es la estimulación de la población de bacterias probióticas con capacidad de producir hidrolasas de sales biliares. Los ácidos biliares son sintetizados en el hígado a partir de moléculas de colesterol y secretados como sus conjugados con glicina o taurina en el intestino delgado, en donde emulsionan grasas y vitaminas liposolubles facilitando su absorción. En humanos hay dos sales biliares principales, el ácido cólico (CA) y el ácido quenodeoxicólico (CDCA) y tres secundarias, ácido deoxicólico (DCA), ácido litocólico (LCA) y ácido deursodeoxicólico (UDCA), con sus respectivas glicinas y taurinas conjugadas. Una vez cumplen su función digestiva, aproximadamente el 95% de las sales biliares regresan al hígado para su reutilización varias veces al día cumpliendo un ciclo enterohepático, el 5% restante son eliminados por acción de los microorganismos de la microbiota intestinal al sufrir deshidroxilación a ácidos biliares secundarios ó deconjugación de la glicina o de la taurina, perdiendo su acción emulsificante de las grasas, precipitando y siendo eliminadas por las heces. El hígado responde a esa pérdida de sales biliares con un aumento de la síntesis a partir de colesterol endógeno, favoreciendo la disminución de los niveles de colesterol en el organismo. La deconjugación de las sales biliares es catalizada por los enzimas hidrolasas de sales biliares (HSB), los cuales han sido detectados en bacterias intestinales como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* y *Enterococcus* (Begley *et al.*, 2006). La estimulación de estas poblaciones bacterianas debida al consumo de prebióticos tiene entonces un efecto indirecto en la reducción de colesterol sanguíneo.

(iii) Regulación del sistema inmune. Se ha demostrado experimentalmente que los prebióticos

son capaces de generar un efecto positivo en el sistema inmune gastrointestinal. Ese efecto se ha atribuido a su capacidad de modificar la microbiota con la consecuente interacción de antígenos bacterianos con el abundante tejido linfóide presente en el intestino (106 linfocitos/g de tejido), generando un aumento en la producción de Inmunoglobulina A secretora (IgAs), la cual interviene en la primera línea de defensa del sistema inmune. El aumento en la producción de butirato por el consumo de prebióticos con la proliferación de mucosa intestinal sana y funcionalmente activa, favorece una reacción rápida y efectiva frente a agentes potencialmente patógenos y permite la tolerancia sistémica para inmunidad celular y humoral frente a los alimentos. (Cherbut *et al.*, 2003; Roller *et al.*, 2004). Para valorar los cambios en el sistema inmune intestinal derivados del consumo de prebióticos se pueden tener en cuenta diversos parámetros como la inmunoglobulina A secretora (IgAs), la producción de interferón, el análisis de diferentes líneas de células linfoides o macrófagos (Mizubuchi *et al.*, 2005). En ratones alimentados con FOS durante cuatro semanas, se observó un incremento en la producción de IgA en heces y de interferon gama (IFN- γ) e Interleukinas 5, 6 y 10 en cultivos de células de las placas de Peyer de los mismos animales (Hosono *et al.*, 2003). En pacientes con enfermedad de Crohn el consumo de 15g de FOS durante tres semanas logró una estimulación favorable del sistema inmune, un aumento en la población de bifidobacterias y una importante reducción de la enfermedad (Lindsay *et al.*, 2006). Los cambios que el consumo de prebióticos genera en el sistema inmune son diferentes para cada tipo de prebiótico en particular (Kudoh *et al.*, 1999)

(iv) Aumento en la absorción de minerales. Otro efecto positivo del consumo de prebióticos se observó en ratas alimentadas con inulina, las cuales mostraron un incremento en la absorción de calcio y su respectiva fijación en huesos (Roberfroid *et al.*, 2002). El consumo de inulina durante 8 semanas aumentó significativamente la absorción de calcio y la mineralización ósea de adolescentes, siendo esta absorción influenciada también por factores genéticos y la disponibilidad de vitamina D (Abrams *et al.*, 2005). Igualmente, se ha demostrado que la oligofruktosa, glucooligosacáridos, galactooligosacáridos y azúcares alcohol, estimulan la absorción y retención

de algunos minerales, particularmente magnesio, calcio y hierro (Scholz-Ahrens *et al.*, 2001; Scholz-Ahrens *et al.*, 2007).

INVESTIGACIÓN DE PREBIÓTICOS *IN VIVO*

Evaluar los cambios fisiológicos que genera el consumo de prebióticos no es tarea fácil, son muchas las variables que intervienen al realizar estudios relacionados con el sistema gastrointestinal, teniendo en cuenta que en el colon habitan más de 400 especies bacterianas diferentes, con una población de 10^{14} ufc/gramo de tejido aproximadamente. La verificación científica de los beneficios para la salud que aportan los prebióticos cuando son consumidos habitualmente, ha llevado a la identificación de marcadores biológicos capaces de sustentar científicamente dichos efectos. Algunos de estos marcadores son: cambios en la microbiota gastrointestinal y en el metabolismo global del ambiente gástrico, la producción de ácidos orgánicos (Schneeman, 2002); la modulación del sistema inmune, valorando procesos inflamatorios e inmunoglobulinas (Calder and Kew, 2002); la reducción de riesgo de padecer cáncer (Rafter, 2002); la prevención de enfermedades coronarias por reducción del colesterol (Demigne *et al.*, 1995); el aumento de la densidad ósea y la absorción de calcio y otros minerales con la disminución de riesgo de osteoporosis (Weaver and Liebman, 2002), entre otros. Estos beneficios deben ser demostrados con diferentes procedimientos experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo* con animales y finalmente en humanos, para que puedan ser referidos como ciertos a los consumidores, de acuerdo a las normativas regulatorias de los diferentes países.

Modelos experimentales *in vivo*

La utilización de modelos animales de experimentación es una importante herramienta en la investigación y verificación de las propiedades beneficiosas derivadas del consumo de prebióticos. Sin embargo, es fundamental tener en cuenta que antes de elegir un modelo animal se deben evaluar otras posibles alternativas, que sin restar objetividad y validez al experimento, replacen el uso de animales. Es importante planificar perfectamente y

con la adecuada asesoría, las técnicas y procedimientos implicados en la experimentación animal, siguiendo las adecuadas normas de manejo que la ley exige, asegurando así el bienestar animal y la validez del estudio. En los Estados Unidos De América, La NABR (The National Association for Biomedical Research) es la entidad encargada de asesorar las políticas relacionadas con el cuidado animal y de promover las iniciativas legislativas para tal fin, dentro de estas iniciativas el AWA (The Animal Welfare Act) es la ley federal que regula el cuidado, manipulación, tratamiento y transporte de los animales utilizados en el laboratorio. En Europa, existen cinco convenios básicos referentes al bienestar animal, incluido el Convenio europeo para la protección de animales vertebrados y otros propósitos científicos, denominado Convenio 123. En Colombia la investigación con animales se regula mediante la ley 84 de Diciembre 27 de 1989, por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales, haciendo referencia en el capítulo VI, al uso de animales vivos en experimentos e investigación. La finalidad de las normativas es asegurar la protección animal y, en particular, que a los animales utilizados se les concedan los cuidados adecuados, sin causarles dolor, sufrimiento, angustia o lesión de manera prolongada e innecesaria. Existen además en las redes informáticas, herramientas que pueden aportar valiosa información para la toma de decisiones en los procedimientos con animales, como es el caso de la página <http://buscaalternativas.com/>, la cual recomiendo sea consultada, si se pretende hacer experimentación con animales.

Existen diferentes especies animales que son utilizadas en experimentación, la rata, por ejemplo, es un modelo animal con frecuencia empleado debido a características como tamaño pequeño, docilidad, bajo costo y fácil de mantener. La rata es un mamífero y omnívoro, al igual que el hombre, lo que permite que sus dietas sean relativamente comparables, sin embargo existen diferencias en su aparato digestivo. La rata posee un saco voluminoso identificado como ciego que está localizado entre la parte distal del intestino delgado (el ileon) y la parte proximal del colon, allí se almacena el material no digerible y es fermentado por acción de las bacterias. En el colon de la rata, el

tiempo de retención del contenido intestinal es corto con una rápida deshidratación y formación de las heces. En contraste, en el ser humano el colon es el mayor sitio de retención de las materias no digeribles y es allí donde sucede la mayor interacción de las sustancias fermentables con las bacterias intestinales. A pesar de esta diferencia, la rata es un modelo animal que permite una excelente investigación de los procesos que ocurren en el ambiente intestinal y es por ello que ha sido utilizada previamente en algunos estudios para la investigación de prebióticos (Le Blay *et al.*, 1999; López *et al.*, 2001; Montesi *et al.*, 2005; Sarmiento-Rubiano *et al.*, 2007). Otros mamíferos omnívoros utilizados en la investigación de prebióticos han sido, entre otros, los caninos en la investigación del efecto de consumo de Inulina y fructooligosacaridos (Vanhoutte *et al.*, 2005), la protección que ejercen estos prebióticos frente a la infección con salmonella en cachorros (Apanavicius *et al.*, 2007). Y los cerdos para evaluar los cambios en la microbiota por el consumo de fructooligosacaridos (Houdijk *et al.*, 2002).

Para la investigación de prebióticos en humanos, han sido diseñados simuladores del ecosistema microbiano intestinal, consistentes en fermentadores, en los que es posible evaluar *In vitro*, los cambios en la población de microorganismos presentes en muestras gastrointestinales humanas y la producción de metabolitos como el butirato, posterior a la adición en el fermentador de un determinado prebiótico (van de Wiele *et al.*, 2007; van de Wiele *et al.*, 2007)). Los cultivos de células humanas también han sido ampliamente utilizados en el estudio de prebióticos, se observo por ejemplo, que en cultivos de células Caco-2 y HPe-2 la presencia de oligosacáridos inhibe la adherencia de patógenos como la *Escherichia coli* (EPEC) a la superficie epitelial intestinal (Shoaf *et al.*, 2006). El análisis directo de los beneficios del consumo de prebióticos en humanos, solo es posible cuando se esta estudiando el potencial prebiótico de sustancias que tradicionalmente han sido consumidas, en dosis compatibles con una dieta normal y de las cuales se esta plenamente seguro de su inocuidad. Una de las dificultades de estos estudios es la unificación y control de la dieta durante el tiempo de tratamiento de la población analizada. En

voluntarios adultos sanos, se ha estudiado la influencia del consumo de Arabinoxilooligosacaridos en la motilidad intestinal y en el metabolismo bacteriano del colon (Cloetens *et al.*, 2008). Se demostró que el consumo de una mezcla de galactooligosacaridos y fructooligosacaridos disminuye el riesgo de padecer dermatitis atópica en niños durante los primeros seis meses de edad (Moro *et al.*, 2006). Un tratamiento combinado que suministra una mezcla de prebióticos y probióticos, durante dos semanas, a pacientes con síndrome de intestino irritable, fue asociado a la significativa reducción de los síntomas gastrointestinales (Bittner *et al.*, 2005).

Estudio de la microbiota intestinal

El intestino humano es el hábitat natural de un gran número de bacterias, las cuales están principalmente concentradas en el colon, con un importante impacto en la fisiología intestinal y en el estado general del huésped. De las relaciones existentes entre el epitelio colónico, los nutrientes disponibles, la variedad y cantidad de bacterias presentes y la interacción de estas con el sistema inmune asociado a la mucosa colónica, dependen importantes funciones fisiológicas, entre otras, la regulación del colesterol, la absorción de vitaminas y minerales, el desarrollo de la inmunidad y el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal, con todo lo que su deterioro podría implicar sobre la salud del huésped.

El estudio de la microbiota intestinal y las complejas relaciones que establece con el huésped es de fundamental importancia para el desarrollo futuro de la industria alimentaria y la implementación de nuevos prebióticos. El número total de bacterias en el intestino humano, 10^{14} ufc/g, es de diez a veinte veces mayor que el número total de células de todos los tejidos del cuerpo (Suau *et al.*, 1999), por lo que esa masa celular, biológicamente activa, ejerce una gran influencia sobre la salud o enfermedad del huésped. Las técnicas de cultivo tradicionales no logran satisfacer completamente las expectativas en el estudio de la microbiota intestinal, limitándose solo a una pequeña parte de la población debido a la gran cantidad de bacterias no cultivables, la limitada variedad de medios de cultivo selectivos y a la

complejidad de las pruebas bioquímicas. Los métodos moleculares en la caracterización de los genes que codifican para el 16S rRNA, han facilitado la investigación de la microbiota de ambientes complejos como el intestino. La separación de los productos amplificados por PCR en una electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE), produce un perfil de bandas característico de las especies bacterianas presentes, ese perfil se genera por diferencias en la estabilidad química de los fragmentos amplificados en relación con un gradiente de desnaturación, diferenciando los fragmentos de los genes que codifican para el 16S rRNA por la composición de sus bases. PCR-DGGE puede permitir una apreciación casi semicuantitativa al comparar la intensidad de las bandas generadas por dos o más muestras que han sido procesadas bajo las mismas condiciones. La secuenciación de productos de PCR reamplificados directamente de las bandas de DNA escindidas del gel, permite la identificación al nivel de género o especie. La técnica PCR-DGGE ha sido utilizada en estudios de la microbiota intestinal, para evaluar su modificación en procesos patológicos como la colitis en ratones (Bibiloni et al., 2005), la enfermedad de Crohn (Scanlan et al., 2006) y los cambios de la microbiota posteriores a la administración de prebióticos ó probióticos (Deng et al., 2007; Garcia-Albiach et al., 2008; Montesi et al., 2005; Vanhoutte et al., 2006; Sarmiento-Rubiano et al., 2007). Una cuantificación definitiva de una determinada especie o cepa bacteriana presente en un ecosistema complejo, puede lograrse mediante el uso de la técnica PCR cuantitativa y el empleo de cebadores específicos que logren amplificar una secuencia presente en copia única dentro del genoma de la bacteria a cuantificar, lo cual permite establecer una relación directa entre el número de fragmentos amplificados y el número de bacterias presentes en la muestra. La técnica FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) es una nueva tecnología que utiliza sondas de DNA marcadas con un fluoróforo, que puede ser empleada para el seguimiento y cuantificación de poblaciones microbianas en muestras complejas, esta tecnología ha sido utilizada en el estudio de los cambios en la microbiota intestinal en humanos posterior al consumo de prebióticos (Brunser et al., 2006; Smith et al., 2006).

Producción de ácidos orgánicos

Determinar con exactitud la cantidad total de ácidos orgánicos producida diariamente en un organismo es bastante difícil, ya que muchos de ellos entran vía porta a la circulación y son rápidamente metabolizados principalmente en el epitelio intestinal, hígado y músculo. Aun así, es posible hacer una estimación de un aumento en la producción de ácidos orgánicos, cuando se logra hacer una determinación fiable de su presencia en el contenido intestinal y en las heces utilizando métodos cuantitativos. La técnica HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) puede definirse como la transferencia de masas entre una fase estacionaria y una móvil. La mezcla que contiene los compuestos a separar, es forzada a pasar a través de una fase estacionaria impulsada por una fase móvil a alta presión, la mezcla se separa en sus componentes en función de su interacción entre las dos fases. La técnica HPLC es sensible y precisa con un alto poder de resolución y reproducibilidad de los resultados y ha sido utilizada para la determinación de ácidos orgánicos en el estudio de prebióticos. (Fernandes et al., 2000; Guerrant et al., 1982; Manderson et al., 2005). La cromatografía de gases, es otra técnica muy utilizada en la cuantificación de ácidos orgánicos, debido a la naturaleza volátil de estas sustancias, siendo de gran utilidad tanto en experimentación *In vitro* como *In vivo* (Flickinger et al., 2002; Middelbos et al., 2007).

Producción de inmunoglobulina A intestinal

El tracto gastrointestinal es un importante órgano linfático que participa en la regulación inmunológica del organismo, la mucosa intestinal es una barrera protectora contra la colonización de patógenos mediante procesos de exclusión y eliminación inmune, es además, el sitio más importante de presentación antigénica manteniendo la homeostasis por reconocimiento de los antígenos como peligrosos y no peligrosos, jugando un papel fundamental en el control de procesos alérgicos. La regulación inmunofisiológica del intestino está influenciada por la microbiota, la dieta y los antígenos circulantes, es por ello, que el consumo de sustancias que logren modificar el ecosistema intestinal tiene una influencia directa sobre el sistema inmune, como es el caso de los prebióticos.

Uno de los marcadores fundamentales para evaluar si los cambios en el ecosistema intestinal relacionados con el sistema inmune son o no favorables, es la cuantificación de la inmunoglobulina A secretora (IgAs). La IgAs es un dímero de la unidad básica de inmunoglobulina A unido a un componente secretor (polipéptido glicosilado) que le permite mayor estabilidad para el transporte en las membranas, adherencia al mucus y protección contra la digestión proteolítica, con la ventaja adicional que no activa el complemento y no genera reacción inflamatoria. La IgAs es producida por linfocitos B en la lámina propia y es transportada a la superficie de las mucosas. Se encuentra en todas las mucosas y secreciones del organismo pero principalmente en la mucosa intestinal, donde su papel fundamental es la neutralización de virus y antígenos proteicos alimentarios, impidiendo su entrada al torrente sanguíneo y participando en la presentación antigénica. La cuantificación de los niveles de IgAs en muestras intestinales se realiza generalmente mediante la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) tipo sándwich (Mizubuchi *et al.*, 2005; Roller *et al.*, 2004).

Otros parámetros pueden ser analizados con el fin de demostrar un benéfico aumento de la actividad y la adecuada modulación del sistema inmune derivada del consumo de prebióticos. En ratas alimentadas con inulina y oligofructosa en combinación con probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium lactis*, se observó que el consumo de prebióticos generó un aumento en la producción de interleukina-10 en las placas de peyer del ciego, pero no se observaron diferencias significativas en líneas celulares como CD4 y CD8 cuando estas líneas celulares fueron cuantificadas por inmunofluorescencia en muestras de tejido intestinal de estos animales (Roller *et al.*, 2004b).

REFLEXIONES FINALES

La achicoria es una verdura que pertenece a la familia de las Asteráceas cuyo origen se sitúa en las regiones mediterráneas, desde la época de los Romanos se utilizaban sus hojas tomadas en infusión, por sus propiedades medicinales. Esta planta es una fuente importante de fructooligosacáridos e inulina,

componentes que han sido ampliamente estudiados por su efecto prebiótico y sus propiedades funcionales. Aunque estos prebióticos se encuentran en menores proporciones en otros alimentos como la alcachofa, el espárrago, el ajo, la cebolla, el puerro, el tomate o el plátano, son los obtenidos a partir de la chicoria los que han sido más estudiados en sus propiedades funcionales. Actualmente los fructooligosacáridos y la inulina son considerados ingredientes con un importante valor añadido tanto en el área de la salud, como a nivel comercial, siendo adicionados a algunos preparados lácteos, bebidas, alimentos infantiles, productos de repostería y complementos dietéticos. Vale la pena destacar que los alimentos a los cuales se ha adicionado estos componentes prebióticos, algunas veces logran triplicar su valor comercial en algunos países Asiáticos y Europeos.

Colombia, uno de los países con mayor biodiversidad en el planeta, cuenta con más de 41.000 especies de plantas de acuerdo al informe sobre el estado de la biodiversidad en Colombia 2006-2007 del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (http://www.humboldt.org.co/download/INSEB_2006-2007.pdf). Esta riqueza biológica ha permitido a su vez, que se desarrollara a través de los tiempos una gran variedad gastronómica, en la que se encuentran alimentos que además de su valor nutritivo, se les ha atribuido tradicionalmente propiedades medicinales. Este conocimiento milenario que ha sido transmitido de generación en generación, puede ser validado científicamente al demostrar experimentalmente, que el consumo habitual de alguno o algunos de los componentes de un alimento tradicional, tiene efectos beneficiosos para la salud. Estimular la investigación en el área de los prebióticos en Colombia con proyección a la innovación y enriquecimiento de productos, con miras al mercado nacional e internacional, es una importante alternativa para el desarrollo económico y social. Conocer los aspectos principales en los que se ha basado la investigación de prebióticos y algunos de los parámetros y técnicas utilizadas para demostrar científicamente los beneficios de su consumo, puede generar en los jóvenes investigadores colombianos la iniciativa para emprender importantes proyectos en la investigación de nuevos prebióticos.

REFERENCIAS

- Abrams SA, Griffin IJ, Hawthorne KM, Liang L, Gunn SK, Darlington G, Ellis KJ. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 471-476.
- Apanavicius CJ, Powell KL, Vester BM, Karr-Lilienthal LK, Pope LL, Fastinger ND. *et al.* Fructan Supplementation and Infection Affect Food Intake, Fever, and Epithelial Sloughing from Salmonella Challenge in Weanling Puppies. *J Nutr* 2007; 137: 1923-1930.
- Arslanoglu S, Moro GE, Boehm G. Early Supplementation of Prebiotic Oligosaccharides Protects Formula-Fed Infants against Infections during the First 6 Months of Life. *J Nutr* 2007; 137: 2420-2424.
- Balcazar-Munoz BR, Martinez-Abundis E, Gonzalez-Ortiz M. Effect of oral inulin administration on lipid profile and insulin sensitivity in subjects with obesity and dyslipidemia. *Rev Med Chil* 2003; 131: 597-604.
- Bauer-Marinovic M, Florian S, Muller-Schmehl K, Glatt H, Jacobasch G. Dietary resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine and alters proliferation, apoptosis and dedifferentiation in rat colon. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1849-1859.
- Begley M, Hill C, Gahan CGM. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 1729-1738.
- Bibiloni R, Simon MA, Albright C, Sartor B, Tannock GW. Analysis of the large bowel microbiota of colitic mice using PCR/DGGE. *Lett Appl Microbiol* 2005; 41: 45-51.
- Bittner AC, Croffut RM, Stranahan MC. Prescript-Assist probiotic-prebiotic treatment for irritable bowel syndrome: a methodologically oriented, 2-week, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical study. *Clin Ther* 2005; 27: 755-761.
- Brady LJ, Gallaher DD, Busta FF. The Role of Probiotic Cultures in the Prevention of Colon Cancer. *J Nutr* 2000; 130: 410.
- Brunser O, Figueroa G, Gotteland M, Haschke-Becher E, Magliola C, Rochat F. *et al.* Effects of probiotic or prebiotic supplemented milk formulas on fecal microbiota composition of infants. *Asia Pac J Clin Nutr* 2006; 15: 368-376.
- Calder PC, Kew S. The immune system: a target for functional foods? *Br J Nutr* 2002; 88 Suppl 2: S165-S177.
- Campbell JM, Fahey J, Wolf BW. Selected Indigestible Oligosaccharides Affect Large Bowel Mass, Cecal and Fecal Short-Chain Fatty Acids, pH and Microflora in Rats. *J Nutr* 1997; 127: 130-136.
- Cherbut C, Michel C, Lecannu G. The Prebiotic Characteristics of Fructooligosaccharides Are Necessary for Reduction of TNBS-Induced Colitis in Rats. *J Nutr* 2003; 133: 21-27.
- Cloetens L, De Preter V, Swennen K, Broekaert WF, Courtin CM, Delcour JA. *et al.* Dose-Response Effect of Arabinoxyloligosaccharides on Gastrointestinal Motility and on Colonic Bacterial Metabolism in Healthy Volunteers. *J Am Coll Nutr* 2008; 27: 512-518.
- Cummings JH, Macfarlane GT, Englyst HN. Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 415S-4420.
- Delzenne NM, Kok N. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 456S-458.
- Demigne C, Morand C, Levrat MA, Besson C, Moundras C, Remesy C. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br J Nutr* 1995; 74: 209-219.
- Deng ZY, Zhang JW, Li J, Fan YW, Cao SW, Huang RL. *et al.* Effect of polysaccharides of cassiae seeds on the intestinal microflora of piglets. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16 Suppl 1: 143-147.
- Faraji H, Lindsay RC. Characterization of the antioxidant activity of sugars and polyhydric alcohols in fish oil emulsions. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 7164-7171.

- Fernández J, Rao AV, Wolever TMS. Different Substrates and Methane Producing Status Affect Short-Chain Fatty Acid Profiles Produced by In Vitro Fermentation of Human Feces. *J Nutr* 2000; 130: 1932-1936.
- Flickinger EA, Hatch TF, Wofford RC, Grieshop CM, Murray SM, Fahey GC Jr. In Vitro Fermentation Properties of Selected Fructooligosaccharide-Containing Vegetables and In Vivo Colonic Microbial Populations Are Affected by the Diets of Healthy Human Infants. *J Nutr* 2002; 132: 2188-2194.
- García-Albiach R, José M, de Felipe P, Angulo S, Morosini MI, Bravo D. *et al.* Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 91-96.
- Guarner F. Studies with Inulin-Type Fructans on Intestinal Infections, Permeability, and Inflammation. *J Nutr* 2007; 137: 2568S-2571.
- Guerrant GO, Lambert MA, Moss CW. Analysis of short-chain acids from anaerobic bacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 355-360.
- Hosono A, Ozawa A, Kato R, Ohnishi Y, Nakanishi Y, Kimura T, Nakamura R. Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 67: 758-764.
- Houdijk JG, Hartemink R, Verstegen MW, Bosch MW. Effects of dietary non-digestible oligosaccharides on microbial characteristics of ileal chyme and faeces in weaner pigs. *Arch Tierernahr* 2002; 56: 297-307.
- Hughes R, Rowland IR. Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. *Carcinogenesis* 2001; 22: 43-47.
- Hujoel PP, Makinen KK, Bennett CA, Isotupa KP, Isokangas PJ, Allen P, Makinen PL. The optimum time to initiate habitual xylitol gum-chewing for obtaining long-term caries prevention. *J Dent Res* 1999; 78: 797-803.
- Kameue C, Tsukahara T, Yamada K, Koyama H, Iwasaki Y, Nakayama K, Ushida K. Dietary Sodium Gluconate Protects Rats from Large Bowel Cancer by Stimulating Butyrate Production. *J Nutr* 2004; 134: 940-944.
- Kien CL, Blauwiel R, Bunn JY, Jetton TL, Frankel WL, Holst JJ. Cecal Infusion of Butyrate Increases Intestinal Cell Proliferation in Pigs. *J Nutr* 2007; 137: 916-922.
- Knuutila M, Svanberg M, and Hamalainen M. (1989) Alterations in rat bone composition related to polyol supplementation of the diet. *Bone Miner* 6: 25-31.
- Kolida S, Gibson GR. Prebiotic Capacity of Inulin-Type Fructans. *J Nutr* 2007; 137: 2503S-2506.
- Kudoh K, Shimizu J, Ishiyama A, Wada M, Takita T, Kanke Y, Innami S. Secretion and excretion of immunoglobulin A to cecum and feces differ with type of indigestible saccharides. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1999; 45: 173-181.
- Le Blay G, Michel C, Blottiere HM, Cherbut C. Prolonged Intake of Fructo-Oligosaccharides Induces a Short-Term Elevation of Lactic Acid-Producing Bacteria and a Persistent Increase in Cecal Butyrate in Rats. *J Nutr* 1999; 129: 2231-2235.
- Le Leu RK, Hu Y, Young GP. Effects of resistant starch and nonstarch polysaccharides on colonic luminal environment and genotoxin-induced apoptosis in the rat. *Carcinogenesis* 2002; 23: 713-719.
- Lindsay JO, Whelan K, Stagg AJ, Gobin P, Al-Hassi HO, Rayment N. *et al.* Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut* 2006; 55: 348-355.
- Livesey G. Tolerance of low-digestible carbohydrates: a general view. *Br J Nutr* 2001; 85 Suppl 1: S7-16.
- López HW, Levrat-Verny MA, Coudray C, Besson C, Krespine V, Messager A. *et al.* Class 2 Resistant Starches Lower Plasma and Liver Lipids and Improve Mineral Retention in Rats. *J Nutr* 2001; 131: 1283-1289.

- Lupton JR. Microbial Degradation Products Influence Colon Cancer Risk: the Butyrate Controversy. *J Nutr* 2004; 134: 479-482.
- Manderson K, Pinart M, Tuohy KM, Grace WE, Hotchkiss AT, Widmer W. *et al.* In Vitro Determination of Prebiotic Properties of Oligosaccharides Derived from an Orange Juice Manufacturing By-Product Stream. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8383-8389.
- Middelbos IS, Fastinger ND, Fahey GC Jr. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber standards. *J Anim Sci* 2007; 85: 3033-3044.
- Mizubuchi H, Yajima T, Aoi N, Tomita T, Yoshikai Y. Isomalto-Oligosaccharides Polarize Th1-Like Responses in Intestinal and Systemic Immunity in Mice. *J Nutr*. 2005; 135: 2857-2861.
- Montesi A, Garcia-Albiach R, Pozuelo MJ, Pintado C, Goni I, Rotger R. Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. *Int J Food Microbiol* 2005; 98: 281-289.
- Moro G, Arslanoglu S, Stahl B, Jelinek J, Wahn U, Boehm G. A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Arch Dis Child* 2006; 91: 814-819.
- Pereira DI, Gibson GR. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002; 37: 259-281.
- Perrin P, Pierre F, Patry Y, Champ M, Berreur M, Pradal G. *et al.* Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. *Gut* 2001; 48: 53-61.
- Rafter JJ. Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. *Br J Nutr* 2002; 88 Suppl 2: S219-S224.
- Rastall RA, Gibson GR, Gill HS, Guarner F, Klaenhammer TR, Pot B. *et al.* Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol Ecol* 2005; 52: 145-152.
- Roberfroid MB, Cumps J, Devogelaer JP. Dietary Chicory Inulin Increases Whole-Body Bone Mineral Density in Growing Male Rats. *J Nutr* 2002; 132: 3599-3602.
- Roller M, Rechkemmer G, Watzl B. Prebiotic Inulin Enriched with Oligofructose in Combination with the Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* Modulates Intestinal Immune Functions in Rats. *J Nutr*. 2004b; 134: 153-156.
- Roller M, Rechkemmer G, Watzl B. Prebiotic Inulin Enriched with Oligofructose in Combination with the Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* Modulates Intestinal Immune Functions in Rats. *J Nutr* 2004a; 134: 153-156.
- Ross S. Functional foods: the Food and Drug Administration perspective. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1735S-1738.
- Saito M. Role of FOSHU (food for specified health uses) for healthier life. *Yakugaku Zasshi* 2007; 127: 407-416.
- Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR. *et al.* Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr*. 1998; 80 Suppl 1: S147-S171.
- Sarmiento-Rubiano LA, Zuniga M, Perez-Martinez G, Yebra MJ. Dietary supplementation with sorbitol results in selective enrichment of lactobacilli in rat intestine. *Res Microbiol* 2007; 158: 694-701.
- Scanlan PD, Shanahan F, O'Mahony C, Marchesi JR. Culture-Independent Analyses of Temporal Variation of the Dominant Fecal Microbiota and Targeted Bacterial Subgroups in Crohn's Disease. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3980-3988.
- Schneeman BO. Gastrointestinal physiology and functions. *Br J Nutr*. 2002; 88 Suppl 2: S159-S163.
- Scholz-Ahrens KE, Ade P, Marten B, Weber P, Timm W, il Y. *et al.* Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics Affect Mineral Absorption, Bone Mineral Content, and Bone Structure. *J Nutr* 2007; 137: 838S-8846.

- Scholz-Ahrens KE, Schaafsma G, van den Heuvel EG, Schrezenmeir J. Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 459S-464.
- Shoaf K, Mulvey GL, Armstrong GD, Hutkins RW. Prebiotic Galactooligosaccharides Reduce Adherence of Enteropathogenic Escherichia coli to Tissue Culture Cells. *Infect Immun* 2006; 74: 6920-6928.
- Smith SC, Choy R, Johnson SK, Hall RS, Wildeboer-Veloo AC, Welling GW. Lupin kernel fiber consumption modifies fecal microbiota in healthy men as determined by rRNA gene fluorescent in situ hybridization. *Eur J Nutr* 2006; 45: 335-341.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Dore J. Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4799-4807.
- Uhari M, Kontiokari T, Koskela M, Niemela M. Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: double blind randomised trial. *BMJ*. 1996; 313: 1180-1183.
- Uhari M, Kontiokari T, Niemela M. A Novel Use of Xylitol Sugar in Preventing Acute Otitis Media. *Pediatrics* 1998; 102: 879-884.
- van de Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *J Appl Microbiol* 2007; 102: 452-460.
- Vanhoutte T, Huys G, De Brandt E, Fahey GC, Swings J. Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 249: 65-71.
- Vanhoutte T, De Preter V, De Brandt E, Verbeke K, Swings J, Huys G. Molecular Monitoring of the Fecal Microbiota of Healthy Human Subjects during Administration of Lactulose and Saccharomyces boulardii. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 5990-5997.
- Veereman G. Pediatric Applications of Inulin and Oligofructose. *J Nutr* 2007; 137: 2585S-2589.
- Weaver CM, Liebman M. Biomarkers of bone health appropriate for evaluating functional foods designed to reduce risk of osteoporosis. *Br J Nutr* 2002; 88 Suppl 2: S225-S232.
- Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 235-243.
- Wong JMW, Jenkins DJA. Carbohydrate Digestibility and Metabolic Effects. *J Nutr* 2007; 137: 2539S-2546.