

LACTOBACILLUS FERMENTUM CECT5716: Un aliado durante la lactancia



José Antonio Maldonado Lobón
Granada, 2017



ugr

Universidad
de Granada



BIOSEARCH
LIFE

Gf kqt<Wpkgtukf cf "f g'I tpcf c0Vguku'F qevqtcrgu
Cwqt<Lqu² 'Cpvqpkq'O crf qpcf q'Nqd»p
KUDP < 9: /: 6/; 385/553/2
WTK'G wr <lj f itj cpf rghgvB26: 316975; "

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología



***LACTOBACILLUS FERMENTUM* CECT5716:
UN ALIADO DURANTE LA LACTANCIA**

JOSÉ ANTONIO MALDONADO LOBÓN

TESIS DOCTORAL

Granada, 2017

El doctorando José Antonio Maldonado Lobón y las directoras de la tesis M^a Dolores Ruiz López y Mónica Olivares Martín

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de las directoras de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 17 de abril de 2017

Directoras de la Tesis:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ruiz', with a large, sweeping flourish underneath.

Fdo.: M^a Dolores Ruiz López

A handwritten signature in blue ink, consisting of a few simple, connected strokes.

Fdo.: Mónica Olivares Martín

Doctorando:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'José A. Maldonado', with a large, sweeping flourish underneath.

Fdo.: José Antonio Maldonado Lobón



Universidad de Granada



Como Director de la Tesis y hasta donde mi conocimiento alcanza el trabajo ha sido realizado por el/la doctorando/a bajo mi dirección y se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones. Así mismo, el trabajo reúne todos los requisitos de contenido, teóricos y metodológicos para ser admitido a trámite, a su lectura y defensa pública, con el fin de obtener el referido Título de Doctor, y por lo tanto AUTORIZO la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero,

Granada, 17 de abril de 2017

Directoras de la Tesis

Fdo.: Mónica Olivares Martín

Fdo.: Mª Dolores Ruiz López

SR. COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN NUTRICIÓN Y CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

A mi abuelo

Tras tantas y tantas horas de “poyata y ordenador”, de leer y escribir, de pipetear y plaquear, ha llegado el momento de dar por finalizada esta etapa de mi vida. Nadie me dijo que lo más complicado sería escribir estas líneas, ¿cómo se puede agradecer a tanta gente en tan poco espacio? Pues con una sola palabra: GRACIAS.

Comenzaré por mis directoras, quienes me han prestado toda la ayuda y colaboración posible hasta llegar a este momento. A la Dra. M^a Dolores Ruiz por guiarme en todos los trámites burocráticos, así como la ayuda prestada en la corrección de esta Tesis y sus consejos. A la Dra. Mónica Olivares, por confiar en mí y ofrecerme la oportunidad de trabajar con ella. Son ya más de 7 años desde que comencé en prácticas en la empresa aquel “Día de la Cruz” del año 2010, durante los cuales me ha enseñado muchísimas cosas del mundo de la investigación y me ha ayudado a comenzar a formarme como científico.

A todos mis compañeros de trabajo, quienes me habéis ayudado y animado en todo momento, fomentando un ambiente de trabajo excepcional (incluso en los malos momentos). A Lluís y Belén, quienes me enseñaron en su día lo que era ser doctorando... ¡quién me iba a decir a mí que seguiría vuestros pasos! A Ana, que comenzó en la empresa el mismo día que yo y hemos tenido caminos paralelos, aunque me adelantó y ya la podemos llamar doctora ¡con todo el mérito del mundo! A ver con qué viaje nos sorprende próximamente... A Rafael, digo... a Roberto, que siempre se ha interesado por cómo iba este trabajo y ha estado dispuesto a ayudar en lo que hiciera falta. A Óskar, capaz de resolver cualquier duda sobre biología molecular y siempre dispuesto a echarme un cable. A Juristo, que me acogió en su departamento y me dió la oportunidad de ir creciendo profesionalmente. A Carlos y Antonio, esas personas con una vitalidad y capacidad de trabajo brutal, por todas esas horas de dedicación y ayuda que me han prestado para que esto llegase a buen puerto. Será por placas Petri, tubos, botes, PCRs... ¡si todo eso hablara! Qué grandes (y duros) momentos hemos pasado. A mi compi M^a Paz, que me aguanta todos los días y ha compartido más de un truquillo y consejo conmigo sobre todo este mundillo. Ahora tendremos que buscarnos otro entretenimiento en vez de idear fechas para la defensa de esta Tesis.

Tengo que salir de mi departamento para agradecer su apoyo y amistad a María, Raquel, Alberto Garach y Yanis, que son los “vecinos de enfrente” a los que pedirle esa pizca de sal que siempre me falta. A mi gente de Desarrollo que, a pesar de no tener tanto contacto diario, siempre han tenido

palabras de ánimo para mí... a Chema y Álvaro, por tantas risas juntos durante este tiempo. No me quiero olvidar de nadie, así que GRACIAS a todos mis compañeros de Biosearch.

Por último y no por ello menos importante, a mis seres queridos. A mi abuela, que desde pequeño me cuidó y procuró que no me faltase de nada. A mi tía Toñi y Pepe Luís, que siempre están ahí para lo que necesite y sé que puedo contar con ellos en cualquier momento. A mi hermana, que a pesar de todas las peleas típicas de cuando éramos pequeños la quiero con locura y sabemos que nos tenemos el uno al otro para cualquier cosa. A mi madre, que me dio la vida y toda la fuerza del mundo para que consiguiera aquello que me propusiese en la vida. Madre no hay más que una, pero como la mía ninguna. A mi padre, espejo en el que me he fijado desde que tengo uso de razón para realizarme como persona, pero que necesitaría varias vidas para llegar a ser como él. Ejemplo de humildad, seguridad, paciencia y tenacidad.

A Paco y Ángeles, que me tratan como si fuera un hijo más todos los días. A Trini, Paco, Manuel y Nieves, que se interesan por mi trabajo cada vez que nos vemos. Y a mis sobris, bichos como ellos solos, que te hacen olvidar cualquier problema con su inocencia.

Y como no, a mi mujer, a mi pequeñaja. Es el sol que ilumina todos los días de mi vida. Ella casi que podría defender este trabajo mejor que yo, tanto por su capacidad como por la de veces que ha tenido que soportarme explicándole lo que hacía. Porque ha aguantado todas mis rabietas, enfados y frustraciones. Ella, que me aguanta todos los días y me saca una sonrisa con una simple mirada.

Son muchos sentimientos y muchas cosas las que se pueden expresar, estoy seguro que se me olvidan personas, lo siento de antemano. No quiero extenderme más, que eso ya lo he hecho en el resto de esta Tesis, así que termino con un consejo que me dieron hace 18 años: *“tanto en la vida como en los pasos... ¡siempre de frente buena gente!”*

INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| 1. Alimentación del lactante..... | 3 |
| 1.1 La leche humana: composición y funcionalidad..... | 3 |
| 1.1.1 Proteínas | |
| 1.1.2 Nucleótidos | |
| 1.1.3 Hidratos de carbono | |
| 1.1.4 Grasas | |
| 1.1.5 Minerales y oligoelementos | |
| 1.1.6 Vitaminas | |
| 1.1.7 Poliaminas | |
| 1.1.8 Componentes inmunológicos de la leche humana | |
| 1.1.8.1 Protección frente a infecciones gastrointestinales y respiratorias | |
| 1.1.8.2 Modulación de la respuesta inmunológica del lactante | |
| 1.1.9 Beneficios para la madre | |
| 1.1.10 Contraindicaciones de la lactancia natural | |
| 1.2 Lactancia artificial..... | 33 |
| 1.2.1 Estudio comparativo entre leches de mujer y vaca | |
| 1.2.2 Fórmulas lácteas infantiles | |
| 2. Origen de la Microbiota..... | 48 |
| 2.1 Adquisición de la microbiota intestinal humana | |
| 2.2 Microbiota de la leche humana | |
| 2.3 Mecanismos de transferencia bacteriana madre-hijo | |
| 3. La microbiota del tracto gastrointestinal..... | 58 |
| 3.1 Composición y distribución | |
| 3.2 Funciones de la microbiota intestinal humana | |
| 3.2.1 Función metabólica | |
| 3.2.2 Función protectora frente a infecciones | |
| 3.2.3 Función inmunológica, GALT y células asociadas | |
| 3.3 El eje intestino-cerebro | |
| 4. Probióticos..... | 77 |
| 4.1 Definición | |
| 4.2 Criterios de selección | |
| 4.3 Seguridad | |
| 4.3.1 Resistencia a antibióticos | |
| 4.3.2 Actividades metabólicas | |
| 4.3.3 Identificación de las cepas seleccionadas | |
| 4.3.4 Estudios en animales | |
| 4.3.5 Estudios en humanos | |
| 4.4 Funcionalidad | |
| 4.4.1 Resistencia durante el tránsito por el aparato digestivo | |
| 4.4.2 Adhesión y colonización intestinal | |
| 4.4.3 Inmunomodulación | |
| 4.4.4 Neuromodulación | |
| 4.4.5 Propiedades antimicrobianas | |
| 4.4.6 Aspectos tecnológicos | |
| 4.5 Aplicaciones de los probióticos | |

| | |
|--|-----|
| 5. Probióticos en fórmulas lácteas para lactantes..... | 103 |
| 5.1 Seguridad | |
| 5.2 Efectos | |
| 5.2.1 Infecciones gastrointestinales | |
| 5.2.2 Infecciones respiratorias | |
| 5.2.3 Desorden intestinal menor | |
| 5.2.4 Alergias | |
| 5.2.5 Diarrea aguda al consumo de antibiótico | |
| 5.2.6 Enterocolitis necronizante | |
| 6. La mastitis durante la lactancia..... | 109 |
| 6.1 Definición | |
| 6.2 Epimiología | |
| 6.3 Causas | |
| 6.4 Patología | |
| 6.5 Tratamiento | |
| 7. Probióticos en el tratamiento de la mastitis..... | 129 |
| 8. <i>Lactobacillus fermentum</i> CECT5716..... | 134 |
| 8.1 Origen e identificación | |
| 8.2 Características antibacterianas | |
| 8.3 Características inmuno moduladoras | |
| JUSTIFICACIÓN..... | 143 |
| OBJETIVOS..... | 147 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 151 |
| RESULTADOS..... | 175 |
| DISCUSIÓN..... | 209 |
| CONCLUSIONES..... | 227 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 231 |
| ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES..... | 295 |

INTRODUCCIÓN

Tabla 1-1. Principales componentes de la leche humana.

Tabla 1-2. Principales péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis de las proteínas de la leche humana y de vaca.

Tabla 1-3. Hormonas y factores de crecimiento más importantes de la leche humana.

Tabla 1-4. Oligosacáridos de la leche humana como receptores de microorganismos

Tabla 1-5. Composición lipídica de la leche humana

Tabla 1-6. Diferencias en macronutrientes entre leche humana y leche de vaca

Tabla 1-7. Contenidos en minerales y vitaminas de la leche humana y la leche de vaca

Tabla 1-8. Normativa sobre el contenido en energía y nutrientes de las fórmulas de inicio y de continuación

Tabla 2-1. Bacterias aisladas de la leche humana

Tabla 4-1. Especies bacterianas utilizadas como probióticos

Tabla 4-2. Lista de bacterias QPS (Qualified Presumption of Safety)

Tabla 4-3. Valores correspondientes a los MIC

Tabla 4-4. Aplicaciones de los probióticos en patologías médicas

Tabla 6-1. Factores de riesgo de desarrollar mastitis relacionados con la lactancia

Tabla 6-2. Valores de leucocitos y bacterias en leche materna en diferentes situaciones clínicas

Tabla 6-3. Tipos de mastitis, agentes etiológicos, sintomatología característica y tratamiento empírico.

Tabla 6-4. Nivel de riesgo y parámetros cinéticos de diversos medicamentos empleados en el tratamiento de las mastitis.

Tabla 8-1. Ensayos de difusión en agar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Cepas bacterianas usadas.

Tabla 2. Oligos, rango dinámico, eficiencia de amplificación y el factor de correlación de cada curva

Tabla 3. Cepas bacterianas usadas.

Tabla 4. Contaje de colonias en la dilución 1/10000.

Tabla 5. Concentración de cada microorganismo en la mezcla.

Tabla 6. Oligos, rango dinámico, eficiencia de amplificación y el factor de correlación de cada curva.

RESULTADOS

Tabla 1. Características basales de los participantes en el estudio.

Tabla 2. Parámetros antropométricos basales a 1, 4 y 6 meses.

Tabla 3. Conducta alimentaria relacionada.

Tabla 4. Incidencia de enfermedades infecciosas, procesos febriles y tratamientos antibióticos durante la intervención.

Tabla 5. Contaje de la microbiota intestinal en muestras fecales (logaritmo de ufc/g), concentración fecal de ácidos grasos de cadena (AGGC, mg/g de heces) e IgA (mg/g de heces) al inicio del estudio (1 mes de edad), 4 y 6 meses de edad.

Tabla 6. Características basales de los participantes en el estudio.

Tabla 7. Las medidas antropométricas al nacer, 0.5, 1, 2 y 3 años de edad.

Tabla 8. La incidencia de enfermedades infecciosas durante los últimos 12 meses del estudio. de seguimiento.

Tabla 9. Hospitalizaciones y procedimientos quirúrgicos durante el período de estudio

Tabla 10. Parámetros relacionados con la función intestinal y la comodidad de los niños en T3.

Tabla 11. Contaje de la microbiota intestinal en muestras fecales (logaritmo de ufc/g), concentración fecal de ácidos grasos de cadena corta (AGGC, mg/g de heces) e IgA (mg/g de heces) a los 3 años de edad

Tabla 12. Características basales de las voluntarias del estudio.

Tabla 13. Contaje de bacterias (log 10 ufc/mL leche).

Tabla 14. Parámetros inmunológicos en leche materna.

Tabla 15. Resultados de la adaptación española del cuestionario de dolor de McGill.

Tabla 16. Los resultados de la adaptación española del cuestionario de dolor MacGill. Los valores se muestran como porcentaje de sujetos seleccionar al menos un elemento de cada subescala.

Tabla 17. El consumo de analgésicos

INTRODUCCIÓN.

Figura 1-1. Funciones biológicas de los nucleótidos.

Figura 1-2. Perfil de oligosacáridos por HPAEC-PAD de las leches humana (A), ovina (B), bovina, (C) y caprina (D).

Figura 1-3. Esquema de la estructura del triglicérido. R, ácido graso; R1, R2, y R3 indican los ácidos grasos en las posiciones sn-1, sn -2 y s-3, respectivamente.

Figura 1-4. Triglicéridos más frecuentes en la leche materna (% respecto al total).

Figura 1-5. Transferencia de inmunidad de la madre al lactante. A: órganos, y B: mucosas implicadas.

Figura 1-6. Componentes inmunológicos de la leche humana.

Figura 2-1. Modelo hipotético de transferencia de bacterias desde la madre al feto y al tracto gastrointestinal del recién nacido.

Figura 2.2. Principales bacterias de la microbiota intestinal del lactante amamantado.

Figura 2-3. Posible mecanismo mediante el cual las bacterias evitan ser fagocitadas.

Figura 2-4. Translocación bacteriana a través de la mucosa intestinal.

Figura 2-5. Cambios fisiológicos y hormonales que pueden afectar al intercambio bacteriano.

Figura 3-1. Factores que influyen sobre el desarrollo de la microbiota en niños

Figura 3-2. Distribución de las poblaciones bacterianas en el tracto gastrointestinal.

Figura 3-3. Representación de los elementos que componen el GALT, tanto el GALT de tipo difuso como el organizado.

Figura 3-4. Receptores TLR.

Figura 3-5. Eje cerebro-intestino-microbiota.

Figura 3-6. Regulación de la salud infantil y el desarrollo en la vida temprana por el microbioma genómico del huésped.

Figura 4-1. Probióticos: ensayos relacionados con la funcionalidad.

Figura 4-2. Probióticos: principales mecanismos de acción.

Figura 4-3. Mecanismo de probiosis en el tracto gastrointestinal.

Figura 4-4. Tipos de respuesta inmune frente a distintos estímulos.

Figura 4-5. Diferencias en la inmunomodulación dependiendo de la existencia, o no, de estimulación.

Figura 6-1. Disbiosis y etiopatogenia de la mastitis: Representación esquemática del epitelio y de los conductos mamarios en condiciones fisiológicas (A) y en situación de mastitis (B).

Figura 6-2. Representación esquemática del proceso de formación de una biopelícula o biofilm en el interior de los conductos galactóforos durante una mastitis.

Figura 7-1. Areola mamaria a los 0 y 14 días del tratamiento con probióticos.

Figura 8-1. Inhibición de la adhesión a células intestinales de cerdo de *S. choleraesuis* marcada con fluorescencia y en condiciones de competencia a diferentes dosis de *L. fermentum* CECT5716.

Figura 8-2. Mortalidad por infección de *S. choleraesuis* (5×10^6 ufc) en ratones tratados y no tratados con *L. fermentum* CECT5716 (1×10^8 ufc/día durante 2 semanas).

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 1. Esquema general del estudio (Fase 1).

Figura 2. Esquema general del estudio.

Figura 3. Esquema general del estudio.

RESULTADOS

Figura 1. Diagrama de flujo de participantes.

Figura 2. Percentiles medios de peso, longitud y perímetro de la cabeza para niños y niñas de cada grupo.

Figura 3. Z-scores.

Figura 4. Diagrama de flujo de participantes.

Figura 5. Percentiles de peso y talla de niños y niñas incluidos en el estudio.

Figura 6. Percentiles de perímetro craneal de niños y niñas incluidos en el estudio.

Figura 7. Puntuación Z para peso corporal, talla y perímetro craneal por edad.

Figura 8. Diagrama de flujo de participantes.

Figura 9. Evolución puntuación de dolor.

| | |
|-----------------|---|
| AA: | Ácido araquidónico. |
| AAP: | American Academy of Pediatrics (Asociación Americana de Pediatría). |
| ACE: | Enzima de la conversión de la angiotensina. |
| ADN: | Ácido desoxirribonucleico. |
| AGCC: | Ácidos grasos de cadena corta. |
| AGPI-CL: | Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. |
| ALA: | Ácidos α -linolénico. |
| BHI: | Medio de cultivo Brain Heart Infusion. |
| CECT: | Colección Española de Cultivos Tipo. |
| CEE: | Comunidad Económica Europea. |
| DC-SIGN: | Receptor de lecitina. |
| DE: | Desviación estándar. |
| DHA: | Ácido docosahexaenoico. |
| DM (1 o 2): | Diabetes Mellitus (tipo 1 o 2). |
| EEUU: | Estados Unidos. |
| EFSA: | European Food Safety Authority (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria). |
| EGF: | Factor de crecimiento epidérmico. |
| EIC: | Eje intestino-cerebro. |
| EII: | Enfermedad inflamatoria intestinal. |
| ELISA: | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas). |
| EPA: | Ácido eicosapentaenoico. |
| ESPGHAN: | European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica). |
| FAE: | Monocapa de células que separa el tejido linfóide del lumen intestinal. |
| FAO: | Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). |
| FDA: | Food and Drug Administration (Estados Unidos). |
| FIBAO: | Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental. |
| GALT: | Gut-Associated Lymphoid Tissue (Tejido linfóide asociado a la mucosa intestinal). |
| GH: | Hormona del crecimiento. |
| GLMs: | Modelos lineales generalizados. |
| GOS: | Galactooligosacáridos. |
| GRAS: | Generally Recognized As Safe (Reconocido generalmente como seguro). |
| GUM: | Tracto genitalurinario. |
| HDL: | High density lipoprotein (lipoproteína de alta densidad). |
| HPA: | Eje hipotálamo-pituitario-adrenal. |
| IFN- γ : | Interferón gamma. |
| Ig: | Inmunoglobulina. |
| IGF: | Factor de crecimiento insulínico. |
| IEL: | Linfocito intraepitelial. |
| IL: | Interleucina. |

| | |
|------------------------------|--|
| LA: | Ácido linoleico. |
| LDL: | Low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad). |
| LGG: | <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> . |
| LMM: | Modelo lineal mixto. |
| LMGM (o RM): | Mucosa de la glándula mamaria. |
| LPS: | Lipopolisacárido. |
| LRM: | Modelos de regresión lineal. |
| NASPGHAN: | North American Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (Sociedad Norteamericana de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica). |
| MIC: | Concentración mínima inhibitoria. |
| MLN: | Nódulo linfático mesentérico. |
| MQP: | Cuestionario de valoración del dolor. |
| MRS: | Medio de cultivo de Man, Ragosa, Sharpe. |
| MUC: | Glóbulo graso de la leche. |
| NK: | Natural Killer. |
| NNT: | Número necesario a tratar. |
| PCA: | Plate count agar. |
| PCR: | Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa). |
| PP: | Placas de Peyer. |
| PRR: | Receptores de reconocimiento de patrones. |
| QPS: | Qualified Presumption of Safety. |
| rDNA: | DNA ribosómico. |
| SDA: | Ácido estearidónico. |
| SLGM: | Mucosa de las glándulas salivares y lacrimales. |
| SNC: | Sistema nervioso central. |
| SPSS: | Statistical Product and Service Solutions (programa estadístico informático) |
| TGF- (α ; β): | Factor de crecimiento transformante (alfa; beta). |
| TGI: | Tracto gastrointestinal. |
| Th1/Th2: | Células secretoras de citoquinas. |
| TLR: | Toll-like receptors. |
| TNF- α : | Factor de necrosis tumoral alfa. |
| TNO: | Netherlands Organisation for Applied Scientific Research. |
| UE: | Unión Europea. |
| UFC: | Unidades formadoras de colonias |
| WHO / OMS: | World Health Organization/Organización Mundial de la Salud. |
| 16S rDNA: | Gen que codifica la fracción 16S del rRNA. |
| 16S rRNA: | Fracción 16S (subunidad menor) del rRNA. |

1.- INTRODUCCIÓN

1. ALIMENTACIÓN DEL LACTANTE.

La nutrición en el primer año de vida es sumamente importante ya que deberá de satisfacer todas las necesidades en cuanto al crecimiento y desarrollo de los tejidos y órganos. Por ello, debe de ser una alimentación equilibrada, completa y que haga que favorezca la maduración de todas las funciones, tanto digestivas como metabólicas. Numerosos estudios han relacionado una mala nutrición en esta etapa de la vida con posteriores enfermedades y patologías de tipo crónico, por lo que este no es sino otro factor más a tener en cuenta de la importancia de una correcta alimentación en este primer estadio de la vida.

La leche humana es el mejor alimento para el lactante, por las innumerables ventajas que representa para el niño por sus características inmunológicas, psicoafectivas, económicas, y nutricionales, ya que le aporta todos los nutrientes para un correcto desarrollo debido a su compleja composición. La recomendación actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS), es que la lactancia materna exclusiva tenga una duración de 6 meses y que se mantenga, si es posible, hasta los 2 años o más (OMS, 2001).

1.1. LA LECHE HUMANA: COMPOSICIÓN Y FUNCIONALIDAD.

La alimentación del lactante pasa por dos períodos, motivados por el grado de madurez digestiva, renal y del sistema nervioso, así como por las necesidades para el crecimiento. El *período de lactancia exclusiva* abarca los 4-6 primeros meses de la vida durante los cuales el único alimento que toma el lactante es la leche humana o de fórmula. El *período de transición o de alimentación complementaria* comprende desde los 4-6 meses hasta los 12 meses de edad, y se caracteriza por la diversificación alimentaria.

La leche humana es un fluido biológico específico de la especie, cuya composición está específicamente adaptada a las características digestivas y a las necesidades nutritivas y de crecimiento del lactante. La leche humana es una solución compleja que no solo contiene nutrientes (hidratos de carbono, proteínas, glóbulos grasos en emulsión, minerales y vitaminas), sino que también aporta enzimas de carácter digestivo, sustancias bacteriostáticas, factores bifidógenos, factores de crecimiento y desarrollo, así como bacterias y otras sustancias bioactivas que le dan el carácter de alimento funcional. Además, aporta beneficios inmunológicos, psicológicos e incluso económicos. Por ello, la

leche humana debe considerarse el alimento óptimo, único e inigualable, y constituir el modelo cuando se pretenda sustituir por otro producto dietético (fórmulas lácteas).

Etapas de la lactancia.

Se entiende por lactancia natural o materna exclusiva el periodo de la vida que comprende los primeros 4-6 meses, durante el cual el lactante se alimenta única y exclusivamente de leche humana. En función de la composición de la leche humana se distinguen varias fases en la lactancia materna (Nascimento y col. 2003; García-López, 2011; Ballard y col. 2013):

- *Calostro*. Es la leche que se produce en los primeros 4-6 días postparto. Tiene menos concentración energética y un contenido más elevado en componentes inmunológicos tales como leucocitos, inmunoglobulina A secretora (IgAs) y lactoferrina, así como oligosacáridos, diversos minerales, colesterol, ácidos grasos esenciales, vitaminas A, E y K y factor de crecimiento intestinal, en comparación con la leche madura. Su alto contenido en proteínas y minerales (sodio, cloro y potasio), así como su baja concentración de grasa y lactosa, reflejan las necesidades del recién nacido durante la primera semana de vida. Sin embargo, lo más llamativo del calostro es la variedad de macromoléculas con un papel bioprotector (Neville y col. 2001). Además, el calostro facilita la colonización intestinal por géneros bacterianos como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Por su contenido en motilina, tiene efectos laxantes que ayudan a la expulsión del meconio.

- *Leche de transición*. Esta segunda fase se extiende hasta la segunda semana postparto. Durante estos días la composición cambia con respecto al calostro: disminuye la cantidad de inmunoglobulinas, proteínas, factores de crecimiento, vitaminas liposolubles y oligosacáridos y aumenta la lactosa, la grasa y las vitaminas hidrosolubles, hasta alcanzar la composición de la leche madura.

- *Leche madura*. En esta última fase, que se prolonga hasta el final de la lactancia, la leche es ya una mezcla de tres fracciones: emulsión (gotas de grasa), suspensión (micelas de caseína) y solución (componentes solubles en agua). Los componentes nutricionales de esta leche madura dependen de varios factores como pueden ser el estado nutricional de la madre, la edad, la fase de lactancia, la hora

del día, la ingesta proteica, número de partos e instauración de la menstruación, entre otros factores maternos (Rodríguez-Palmero y col. 1999; Ballard y col. 2013).

Composición nutricional de la leche humana.

Para el análisis de sus macro y microcomponentes hay que tener en cuenta que la leche humana es un alimento en continua evolución, ya que su composición varía con la fase de la lactancia. Además, depende de factores individuales de la madre lactante, como se ha referenciado en el apartado anterior. Por esta razón nos referiremos a lo que se conoce como “composición media de la leche humana”, que es la que se utiliza como referencia para la elaboración de las fórmulas lácteas para lactantes (tabla 1-1).

1.1.1. Proteínas.

El contenido total de proteínas de la leche humana es el más bajo de todos los mamíferos (0,8-1,2%), debido al crecimiento relativamente lento del niño. Su concentración no se afecta por la dieta materna, pero se incrementa con el peso para la talla de la madre y desciende en las mujeres que producen altas cantidades de leche (Ballard y col. 2013). El tipo de proteínas que contiene la leche humana la hacen única para la especie humana, ya que son de mejor biodisponibilidad gracias a la presencia de enzimas proteolíticas importantes para el desarrollo neonatal (Lawrence y col. 2007).

La relación entre caseínas y proteínas del suero influye en los beneficios de la leche humana.

Las proteínas mayoritarias de la leche humana se dividen en caseína y proteínas del suero (López Álvarez, 2007). La relación caseína/proteínas del suero difiere de unas madres a otras, pero en general se acepta que en los primeros 10 días posparto la leche humana tiene una relación caseína/proteínas del suero de 10/90; cambia a 40/60 hasta los ocho meses y se mantiene en 50/50 hasta el fin de la lactancia. Esta proporción caseína/proteínas del suero es muy diferente del valor 80/20 que presenta la leche de vaca; esta menor proporción de caseína presente en la leche humana facilita la digestión y reduce el tiempo de vaciado gástrico, probablemente debido a la mayor digestibilidad de las proteínas séricas (Akrê, 1994; Lönnérda, 2003a).

Tabla 1-1. Principales componentes de la leche humana.

| | <i>Leche humana</i> |
|----------------------------|---|
| Hidratos de Carbono | 6-7 g/100 ml Lactosa Lactooligosacáridos |
| Proteínas y nitrógeno | 0,9-1,1 g/100 ml Predominan proteínas del suero Proteínas de defensa Nitrógeno no proteico |
| Grasas | 4,2 g/100 ml Alto contenido en colesterol y en ácidos oleico, α -linolénico, linoleico, docosahexanoico y araquidónico |
| Minerales | 0,2 g/100ml Calcio/fósforo = 2/1 Alta biodisponibilidad del hierro |
| Minerales | |
| Azufre (mg) | 14 |
| Calcio (mg) | 34 |
| Cinc (mg) | 0,3 |
| Cloro (mEq) | 1,1 |
| Cobalto (μ g) | 1,4 |
| Cobre (μ g) | 39 |
| Fósforo (mg) | 14 |
| Hierro (μ g) | 76 |
| Magnesio (mg) | 2,8 |
| Manganeso (μ g) | 4,1 |
| Potasio (mEq) | 1,3 |
| Sodio (mEq) | 0,7 |
| Yodo (μ g) | 7 |
| Vitaminas | |
| A (μ g) | 55 |
| Ácido fólico (μ g) | 5,2 |
| B ₁₂ (μ g) | 0,05 |
| B ₆ (μ g) | 13 |
| Biotina (μ g) | 0,58 |
| C (mg) | 44 |
| β -caroteno (mg) | 24 |
| D (μ g) | 0,1 |
| E (μ g) | 350 |
| K (μ g) | 0,2 |
| Niacina (μ g) | 230 |
| Riboflavina (μ g) | 35 |
| Tiamina (μ g) | 15 |

Los valores de los nutrientes corresponden a unidades/100 ml (Tomado de Maldonado Lozano y col. 2010).

La α -lactoalbúmina es la proteína del suero más abundante (37%) y su importancia estriba en que actúa como cofactor en la biosíntesis de lactosa (García-López, 2011). Tiene baja alergenicidad debido a un peso molecular de 14.500 Da, mucho menor si se compara con la β -lactoglobulina que llega a pesar 36.000 Da y está presente en la leche entera de vaca y, por tanto, en los preparados lácteos para la alimentación de los lactantes (Lönnerdal y col. 2003a; Lönnerdal, 2003b). Durante la digestión de la α -lactoalbúmina se liberan diversos péptidos con función bioactiva que favorecen la absorción de hierro y zinc, estimulan la actividad fagocitaria de los macrófagos, actúan como prebióticos estimulando el crecimiento de las bifidobacterias y tienen efectos antibacterianos frente a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococci* y *Candida albicans*. La acción combinada como prebióticos y como inhibidores de microorganismos patógenos, puede dar lugar a un microbioma que puede afectar a la función inmune (Lönnerdal, 2014).

La caseína, contribuye al transporte de calcio, fósforo y aminoácidos para fines estructurales a nivel celular (López Álvarez 2007). En la leche humana sólo hay dos de las tres subunidades que existen: la β -caseína que se une con la κ -caseína y con los iones de fósforo para formar micelas de pequeño tamaño (30-75 nm) que, comparado con los 600 nm que mide la α -caseína de la leche de vaca, son mejor digeridas en el intestino del bebé (Lönnerdal, 2003a; López Álvarez, 2007)

La composición de aminoácidos de la leche humana está adecuada a las necesidades del recién nacido.

Entre los compuestos nitrogenados de la leche se encuentran los aminoácidos. La leche humana se caracteriza por una baja concentración de fenilalanina y tirosina, aminoácidos aromáticos que son difícilmente metabolizados por el lactante y que a altas concentraciones plasmáticas pueden ser perjudiciales. Otra importante característica es la presencia de taurina, que está ausente en la leche de vaca, y que favorece la digestión de las grasas y el desarrollo del sistema nervioso central (SNC); es crucial para el desarrollo de la retina y para la estabilidad de las membranas celulares (Lawrence, 1994).

Además, la relación cisteína/metionina de la leche humana está próxima a 1, valor siete veces superior al de la leche de vaca (Lawrence, 1994). La transformación de metionina en cisteína está comprometida en el recién nacido debido a la baja actividad del enzima cistationasa. De ahí que la mayor proporción de cisteína sea beneficiosa para el niño. La leche humana contiene carnitina, que el recién nacido no puede sintetizar pero que es vital durante las primeras etapas del desarrollo para la

oxidación de los ácidos grasos de cadena larga (Lawrence, 1994), y el ácido glutámico, la cistina y la glutamina que actúan como neuromoduladores y neurotransmisores.

La leche humana contiene péptidos con actividad biológica.

Como consecuencia de la digestión de las proteínas, aparte de aminoácidos libres, se liberan péptidos que, además de su valor nutricional, tienen una importante actividad biológica (Lönnerdal, 2010). Estos péptidos bioactivos pueden atravesar el epitelio intestinal y así llegar, a través de la circulación sistémica, a los tejidos periféricos en donde pueden ejercer su efecto. En los últimos años se han aislado diferentes péptidos de la leche humana, y también de la leche de vaca, que participan en la regulación de diferentes funciones fisiológicas (tabla 1-2):

Tabla 1-2. Principales péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis de las proteínas de leche humana y de vaca.

| Proteína | Péptidos bioactivos | Origen de la leche | Bioactividad descrita |
|-------------------------|-------------------------------|--------------------|--|
| Caseína α | α -casomorfinina | Vaca | Opiácea |
| | Caseína- α -exorfinina | Vaca | Opiácea |
| | Casokinina | Vaca | Antihipertensiva |
| | β -casomorfinina | Humana/Vaca | Opiácea |
| Caseína β | Casokinina | Vaca | Inmunomoduladora/anti hipertensiva |
| | Caseinfosfopéptido | Humana/Vaca | Biodisponibilidad mineral Motricidad gastrointestinal y Liberación de hormonas |
| | Caseinmacropéptido | Vaca | |
| Caseína κ | Casoxina | Humana | Antagonista opiáceo |
| | Casoplatelinas | Humana | Antitrombótica |
| α -lactoalbúmina | Fragmentos 50-53 | Humana/Vaca | Opiácea |
| β -lactoglobulina | β -lactorfinas | Vaca | Opiácea/antihipertensiva |
| Lactoferrina | Lactoferrinosa | Humana/Vaca | Antagonista opiácea |
| | Lactotransferrina | Humana/Vaca | Antagonista opiáceo |

Adaptado de Baró y col. 2001.

- **Péptidos con efecto sobre el sistema digestivo.** Se han aislado péptidos con actividad opiácea, que se unen a receptores en el lumen intestinal y actúan como moduladores exógenos de la motilidad gastrointestinal, de la permeabilidad intestinal y de la liberación de hormonas intestinales. Entre ellos, los llamados α y β casomorfinas capaces de reducir la motilidad intestinal, por lo que se estudia su posible papel beneficioso en el tratamiento de la diarrea (Baró y col. 2001; Ballard y col. 2013).

- **Péptidos con efectos inmunomoduladores y antimicrobianos.** Este otro grupo ejerce un papel protector sobre el organismo, ya sea potenciando el sistema inmune o ejerciendo una actividad antimicrobiana (Baró y col. 2001; Lönnerdal, 2014).

- **Péptidos con efectos sobre el sistema cardiovascular.** Los principales efectos descritos en este campo son la actividad antihipertensiva (casokinina que inhibe de la enzima de conversión de la angiotensina) (Schlimme y col. 1995), y la actividad antitrombótica (casoplatelinas que inhiben la agregación plaquetaria) (Jolles y col. 1986).

Agentes antimicrobianos, antiinflamatorios e inmunomoduladores.

Constituyen uno de los aspectos más singulares de la leche humana. Se pueden distinguir componentes proteicos como lactoferrina, proteína fijadora de la vitamina B₁₂, proteína fijadora del ácido fólico, lisozima, lactoperoxidasa, fibronectina, inmunoglobulinas (principalmente IgAs), factores del complemento (C3, C4), interferón y mucinas, así como otros compuestos no proteicos como oligosacáridos, gangliósidos y factores de resistencia específica antiestafilocócicos.

La lisozima es un potente agente antiinfeccioso y su actividad parece incrementarse a lo largo de la lactancia. El efecto antimicrobiano de la lisozima se ejerce gracias a su capacidad de destruir los peptidoglucanos de la pared bacteriana (Lönnerdal, 2003a). Actúan como antiinflamatorios diferentes compuestos antioxidantes, lactoferrina, factores de crecimiento epitelial (factor de crecimiento epidérmico [EGF], factor de crecimiento transformante beta [TGF- β]), poliaminas, inhibidores de proteasas (como la α_1 -antiquimotripsina y α_1 -antitripsina), citoquinas y prostaglandinas. Actúan como agentes inmunomoduladores las citoquinas (principalmente el factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α] e interleuquinas como IL-1 β , IL-6, IL-10, interferón gamma [IFN- γ]) y nucleótidos.

La lactoferrina es uno de los componentes proteicos más importantes de la leche humana.

La lactoferrina es una proteína altamente insaturada, quelante del hierro, que se encuentra en la leche humana en cantidades entre 1 y 2 g/l (Steijns y col. 2000) y constituye aproximadamente el 15-20% de la fracción proteica (27% de las proteínas del suero). Su actividad biológica reside en que es capaz de unirse a dos átomos de hierro férrico y posee la capacidad de resistir a la acción de las enzimas proteolíticas, especialmente en su forma saturada de hierro. Se ha demostrado que parte de la lactoferrina de la leche humana no es digerida y llega intacta al intestino, detectándose en cantidades apreciables en las heces de los lactantes alimentados con lactancia materna (Brines y col. 1983; Davidson y col. 1987), incluso en su orina, lo que prueba que no solo resiste la digestión sino que puede ser absorbida y excretada intacta (Hutchens y col. 1991). Estudios experimentales han puesto de manifiesto que la lactoferrina tiene actividad antibacteriana, antiviral, antioxidante, antiinflamatoria y de inmunomodulación, y posee la capacidad de fijar hierro y otros iones metálicos (Lönnerdal, 2009a).

Debido a que una parte significativa del hierro de la leche humana va unida a la lactoferrina (Lönnerdal 2009a), se ha formulado la hipótesis de que esta proteína podría favorecer la absorción de hierro en los niños alimentados al pecho y contribuir a mantener una concentración sérica de hierro superior a la de aquellos lactantes alimentados con lactancia artificial. De hecho, los niños alimentados con leche humana, que contiene 0,2- 0,4 mg/l de hierro, presentan una concentración sérica de hierro a los seis meses de edad mayor que la de los alimentados con preparados para lactantes, a pesar de que estos preparados contenían mayor cantidad de hierro (0,7 mg/l) (Franson y col. 1980).

Las actividades antimicrobiana y antiviral de la lactoferrina junto con su capacidad de promover el crecimiento en el intestino de especies bacterianas beneficiosas, podrían estar implicadas en la mayor resistencia frente a infecciones gastrointestinales de los niños amamantados (Farnaud y col. 2003; Lönnerdal, 2010). Existen estudios que han demostrado que la lactoferrina promueve el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias (Kim y col. 2004).

Ha sido ampliamente estudiado el papel de la lactoferrina como factor de defensa frente a microorganismos patógenos. En el intestino, la lactoferrina intacta puede tener efectos bacteriostáticos e inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos (Vogel, 2012). No está claro el mecanismo, pero podría deberse a su capacidad de secuestrar hierro e impedir la captación del mismo por las bacterias,

inhibiendo su multiplicación y dificultando la expresión de factores de virulencia (Orsi, 2004; Reyes-Reyes y col. 2005), o bien a la producción de alteraciones en la membrana bacteriana, perdiéndose la integridad de la misma (Nadiu y col. 1997; Farnaud y col. 2003; Vogel, 2012). Incluso se ha postulado que la lactoferrina podría estimular la fagocitosis de monocitos y macrófagos. Por otra parte, es de gran interés la posible acción antiviral de la lactoferrina, que podría deberse a su capacidad de inhibir el proceso de adsorción de la partícula viral por parte de la célula. Esta actividad ha sido demostrada *in vitro* con *Herpes simplex* (Marcheti, 1998; Jenssen, 2005).

Hormonas y factores de crecimiento presentes en la leche humana.

Tanto el calostro como la leche madura contienen hormonas y factores de crecimiento que ejercen efectos sobre el intestino, el sistema vascular, el sistema nervioso y el sistema endocrino (Baró y col. 2001; Ballard y col. 2013). Estos compuestos pueden llegar al epitelio intestinal y atravesarlo gracias a la menor actividad proteolítica y mayor permeabilidad intestinal del recién nacido (tabla 1-3).

Tabla 1-3. Hormonas y factores de crecimiento más importantes de la leche humana.

| Hormona/Factor de crecimiento | Péptidos bioactivos |
|--|---|
| Factor de Crecimiento epidérmico (EGF) | Regulación del desarrollo hepático e intestinal Translocación bacteriana |
| Factor α transformador del crecimiento (TGF- α) | Continuidad y normal funcionamiento del epitelio intestinal |
| Factor β transformador del crecimiento (TGF- β) | Diferenciación del epitelio intestinal Carcinogénesis Producción de IgA Inducción de tolerancia oral |
| Factores de crecimiento insulínico I y II (IGF-I y IGF-II) | Proliferación y diferenciación celular |
| Hormona de crecimiento (GH) | Desarrollo y funcionamiento intestinal |
| Neuropéptidos | Incremento de la producción de IgA Estimulación de células T Producción de IL-12 por macrófagos |

Adaptado de Baró y col. 2001.

El **factor de crecimiento epidérmico** es fundamental para la maduración y la salud y/o curación de la mucosa intestinal. Estimula al enterocito para incrementar la síntesis de ADN, la división celular, la absorción de agua y glucosa y la síntesis proteica (Ballard y col. 2013) y desempeña mecanismos protectores para el intestino del lactante (Khailova y col. 2009).

La inmadurez del intestino del recién nacido se extiende al sistema nervioso enteral, el cual necesita de los factores neurotróficos (**factores de crecimiento neuronal**) para su desarrollo (Rodríguez y col. 2011). Estos factores se han detectado en la leche humana 90 días después del nacimiento (Li y col. 2011; Fichter y col. 2011).

Los **factores de crecimiento insulínico** (IGF-I, IGF-II, proteínas de unión IGF y proteasas específicas IGF), se encuentran en la leche humana; su concentración es mayor en el calostro y disminuye a lo largo del período de lactancia (Ballard y col. 2013). En experimentación animal se ha comprobado que estos factores pueden estimular el crecimiento tisular, atenuar la atrofia intestinal y pueden influir en la supervivencia de los enterocitos tras producirse lesión intestinal por estrés oxidativo.

El **factor de crecimiento del endotelio vascular** y sus antagonistas regulan primariamente la angiogénesis. La concentración de este factor es muy alta en el calostro (Loui y col. 2012). En la retinopatía del prematuro, en donde se produce una disregulación en la vascularización de la retina, la leche humana puede ayudar a reducir el daño por la acción de este factor.

La **eritropoyetina** puede ayudar a prevenir la anemia del prematuro (Soubasi V y col. 1995), aunque los resultados son confusos (Carbonell-Esteyran y col. 2005). En ratas sí se ha comprobado que la administración conjunta de hierro y eritropoyetina incrementa los valores de hemoglobina y hematocrito (Kling y col. 2008). Además, la eritropoyetina es un importante factor trófico de la unión de las células epiteliales del intestino, mejorando la función de la barrera intestinal (Shiou y col. 2011).

La **osteopontina** se encuentra en la leche humana en cantidades relativamente elevadas (Sodek y col. 2000). Esta proteína está implicada en diversos procesos fisiológicos, tales como la activación del sistema inmunológico, cura de heridas, angiogénesis y remodelamiento óseo (Lønnerdal, 2014).

Hormonas como calcitonina, somatotatina, adiponectina, leptina, resistina y grelina, están presentes en la leche humana (Ballard y col. 2013). La **adiponectina**, que se encuentra en grandes cantidades, puede atravesar la barrera intestinal del lactante y puede modificar su metabolismo (Newburg y col. 2010). La concentración de adiponectina en la leche se correlaciona inversamente con el peso y el índice de masa corporal de los lactantes alimentados exclusivamente al pecho, por lo que se ha propuesto que la adiponectina de la leche humana puede contribuir a reducir la incidencia de sobrepeso y obesidad en edades posteriores de la vida (Newburg y col. 2010; Woo y col. 2012).

1.1.2. Nucleótidos.

Los nucleótidos son una serie de compuestos derivados de los anillos de la purina o de la pirimidina, que intervienen en muchos procesos biológicos y han sido propuestos como nutrientes condicionalmente esenciales en el lactante. Aunque los nucleótidos pueden ser sintetizados endógenamente, pueden llegar a ser semiesenciales en determinadas situaciones en las que esta síntesis es insuficiente para cubrir las necesidades, como ocurre en la etapa de crecimiento rápido del recién nacido. (Gil Hernández y col. 2010; Yu, 2002). Los nucleótidos constituyen alrededor del 20% del nitrógeno no proteico de la leche humana, y se estima que el total de ribonucleótidos potencialmente disponibles en la leche es de unos 70 mg/l (Gil Hernández y col. 2010).

Los nucleótidos y sus metabolitos desempeñan un papel clave en numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos, tales como procesos de transferencia de energía o la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos, la del metabolismo de las lipoproteínas y de los ácidos grasos poliinsaturados, la proliferación y la diferenciación de los enterocitos, la modificación de la microbiota intestinal y la estimulación y la modulación del sistema inmunitario (Gil y col. 1996; Sánchez-Pozo y col. 1998; Sánchez-Pozo y col. 2002; Gil Hernández y col. 2010; Rueda Cabrera y col. 2010). Los diferentes efectos de los nucleótidos (figura 1-1) se podrían resumir en los siguientes apartados:

- **Modulación de la respuesta inmunológica.** En los lactantes, la presencia de nucleótidos en la dieta parece inducir un aumento de la actividad *Natural Killer* (NK) y de la producción de IL-2 (Carver, 1996) e influir sobre la maduración, activación y proliferación de los linfocitos, la estimulación de la función fagocíticas de los macrófagos, y sobre la modulación de las respuestas de hipersensibilidad

retardada a injertos y tumores y a la infección, y modulación de la producción de inmunoglobulinas (Martínez-Augustin y col. 1997; Lama More y col. 1998; Navarro y col. 1999; Rueda Cabrera y col. 2010).

- **Tracto gastrointestinal.** Los nucleótidos parecen favorecer el desarrollo normal del epitelio intestinal. Así, experimentos *in vivo* muestran un aumento de la altura de las criptas y una mayor actividad disacaridasa en ratas destetadas que recibieron una dieta suplementada en nucleótidos (Uauy y col. 1990).

- **Función hepática.** La administración exógena de nucleótidos parece mejorar la función hepática y la capacidad de regeneración del hígado en modelos animales de experimentación (Carver, 1996), siendo esta función especialmente importante cuando, por la existencia de enfermedad o lesión hepática, la capacidad del hígado para sintetizar nucleótidos estuviese disminuida.

- **Metabolismo lipídico.** Los nucleótidos inducen un aumento de las concentraciones plasmáticas y eritrocitarias de AGPI-LC en recién nacidos, y en los lactantes alimentados con fórmulas suplementadas con nucleótidos se ha observado unos niveles plasmáticos de HDLc semejantes a los de los lactantes alimentados al pecho (Gil y col. 1996), que inducían un aumento de la apolipoproteína A-IV y de la actividad de la enzima lecitín colesterol acil transferasa (Sánchez-Pozo y col. 1995).

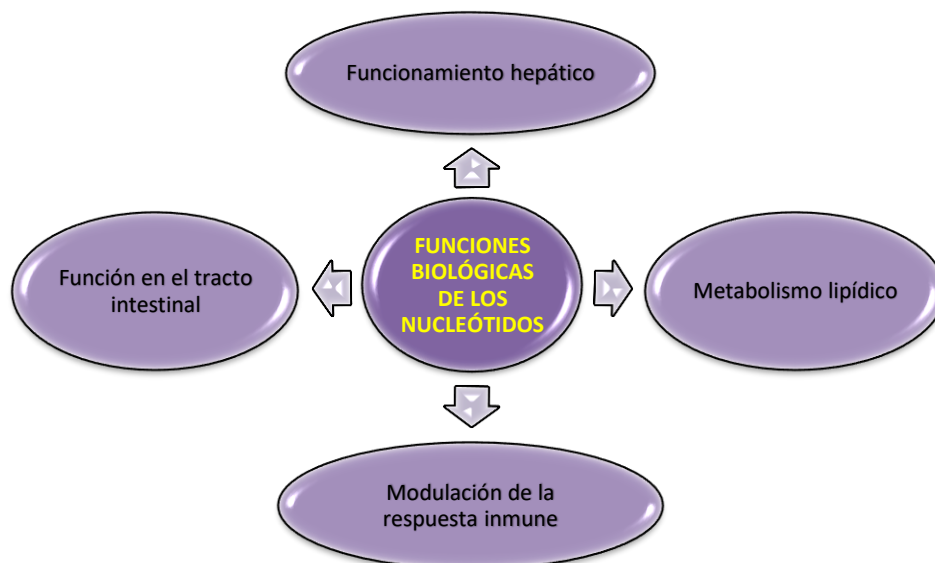


Figura 1.1. Funciones biológicas de los nucleótidos.

1.1.3. Hidratos de Carbono.

La lactosa: una importante fuente de energía de la leche humana.

La leche humana contiene una fracción de hidratos de carbono del 7%, de la cual la lactosa es el componente mayoritario (6,3 g/dl). En el calostro y durante los primeros estadios de la lactancia la concentración de lactosa es relativamente baja, pero rápidamente se incrementa la concentración que permanece estable a lo largo de todo el período que dura la lactancia (Stam y col. 2013).

La lactosa es un componente con una importante función energética ya que, junto con la grasa, aporta la mayor parte de la energía proporcionada por la leche humana. Este disacárido es metabolizado por la lactasa dando lugar a glucosa y a galactosa; este último es un monosacárido crucial para el desarrollo cerebral del recién nacido, ya que es fundamental para la formación de cerebrosidos en el sistema nervioso central (García-López, 2011). De hecho, la mayor concentración de lactosa en la leche humana en comparación con la leche de otros mamíferos, podría estar relacionada con el mayor desarrollo cerebral del hombre (Riordan y col. 2009). Además, la lactosa facilita la absorción del calcio y favorece el desarrollo de una microbiota intestinal protectora (bifidobacterias y lactobacilos) frente a bacterias patógenas e impide el crecimiento de microorganismos patógenos.

Los oligosacáridos: importantes compuestos bioactivos.

Los oligosacáridos constituyen el tercer componente mayoritario de la leche humana tras la lactosa y la grasa, con una concentración que oscila entre 1,2 y 1,3 g/100 ml (Moreno Villares, 2008) que representa el 10% del total de nutrientes. Esta es una de las principales diferencias de la leche humana frente a la de otros mamíferos, como por ejemplo la leche de vaca que sólo contiene trazas de oligosacáridos (Martínez-Férez, 2004) (figura 1-2). Los oligosacáridos de la leche humana presentan una gran variabilidad, habiéndose descrito más de 200 estructuras diferentes (Garrido y col. 2011), estructuras que se pueden dividir en dos grandes categorías: oligosacáridos neutros y oligosacáridos cíclicos (Nakhla y col. 1999). Los oligosacáridos neutros representan el 70% del total e incluyen isómeros de lacto-N-tetraosa, lacto-N-neotetraosa, lacto-N-hexaosa, monofucosil-lacto-N-hexaosa y difucosil-lacto-N-hexaosa (Garrido y col. 2011). Los oligosacáridos ácidos, que contienen ácido siálico o grupos sulfato, están presentes en la leche humana en cantidades relativamente bajas y consisten principalmente en ácido 5-N-acetil-neuramínico (Thurl y col. 2010).

Los oligosacáridos de la leche humana son resistentes a la hidrólisis enzimática del tracto gastrointestinal (Engferi y col. 2000) y existen estudios que demuestran que estos compuestos podrían atravesar el epitelio intestinal, pasando intactos a la circulación sistémica (Gnoth y col. 2001).

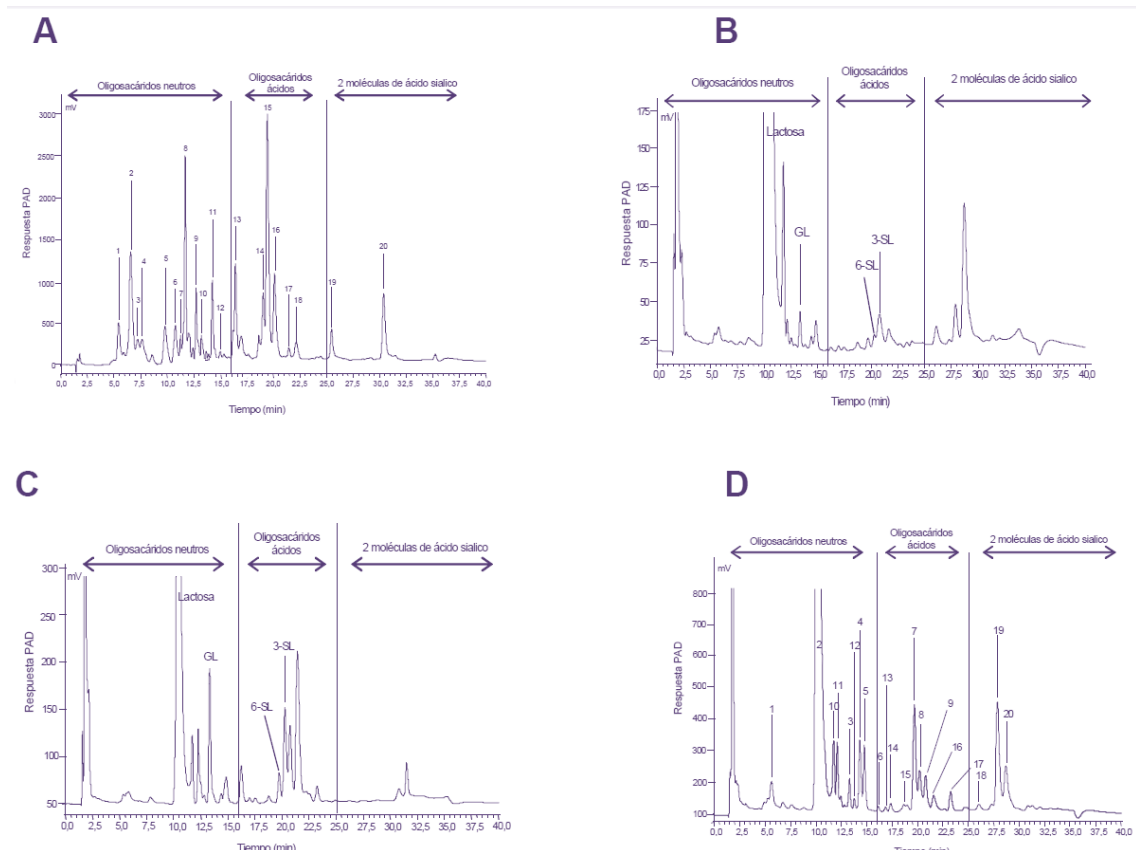


Figura 1-2. Perfil de oligosacáridos por HPAEC-PAD de las leches humana (A), ovina (B), bovina, (C) y caprina (D). (Martínez-Férez A, 2004).

Los oligosacáridos no digeridos llegan al colon, donde pueden ejercer diversas funciones: compiten con los receptores de membrana con las bacterias y virus patógenos en el epitelio intestinal, acidifican el medio a partir de su fermentación por las bacterias del colon, inhibiendo el crecimiento de bacteroides, clostridios y coliformes y promoviendo el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias (Cilla A y col. 2012) y estimulan el sistema inmunitario del lactante. Por ello, los oligosacáridos han cobrado un gran interés en los últimos años, debido a su papel como prebióticos, que al no ser digeridos son utilizados como sustratos por las bacterias intestinales (Mc Veagh y col. 1997).

Cada vez hay más evidencia de que los oligosacáridos de la leche humana actúan directamente sobre el sistema inmune, la mayoría probablemente a través de los receptores específicos en las células inmunes (Bode y col. 2004; Eiwegger y col. 2004; Eiwegger y col. 2010). Se ha demostrado *in vitro* que los oligosacáridos de la leche humana pueden interferir en el reclutamiento de leucocitos en los sitios de inflamación y que pueden inhibir las interacciones célula-célula de los linfocitos a través de las selectinas (Eiwegger y col. 2010), así como que son capaces de unirse específicamente al receptor de lectina DC-SIGN (Naarding y col. 2005). El receptor DC-SIGN interactúa con una variedad de patógenos, incluyendo el VIH-1, y la unión de los oligosacáridos con este receptor inhibió la transferencia del VIH-1 a los linfocitos TCD4+. Estos datos sugieren que los oligosacáridos actúan sistémicamente y modulan con ello la respuesta del sistema inmunológico de una manera independiente de la microbiota. También es de gran interés el posible papel de los oligosacáridos como receptores de patógenos al presentar una similitud estructural con los hidratos de carbono de la superficie de las células intestinales (tabla 1-4), constituyendo un mecanismo de defensa adicional para el recién nacido, cuyo sistema inmunológico no es todavía maduro (Coppa y col. 1993).

Tabla 1-4. Oligosacáridos de la leche humana como receptores de microorganismos.

| Receptores | Microorganismo |
|---|---|
| Glicoproteínas conteniendo manosa | <i>Escherichia coli</i> (fimbria tipo 1) |
| Oligosacáridos fucosilados | <i>E. coli</i> (enterotoxina termoestable) |
| Tetra y pentasacáridos | <i>E. coli</i> |
| Sialil α (2-3) lactosa y glicoproteínas | <i>E. coli</i> (fimbria si) |
| Sialil α (2-3) galactósidos y mucinas | <i>E. coli</i> (fimbria si) |
| Oligosacáridos neutros | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| Epítomos Fuc α (1-2) Gal | <i>Cándida albicans</i> |
| Gal β (1-4) GlcNAc o Gal β(1-3) GlcNAc | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| Sialil lactosa | <i>Helicobacter pylori</i> |
| Sialil lactosa | <i>Streptococcus sanguis</i> |
| Sialil lactosa y glicoproteínas | <i>Helicobacter pylori</i> |
| Glicoproteínas sializadas α (2-3) | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> |
| Poli-N- acetil-lactosaminas | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> |
| α (2-3) poli-Nacetil-lactosaminoglicanos | <i>Streptococcus suis</i> |
| Sialil α (2-3) lactosa | <i>Virus influenza A</i> |
| Sialil α (2-3) lactosa | <i>Virus influenza B</i> |
| 9-0 NeuAc α (2-3) R | <i>Virus influenza C</i> |

Adaptado de Kunz y col. 1993.

El desarrollo y estimulación del sistema inmunitario del lactante también está afectado por los oligosacáridos de la leche humana, y se ha comunicado que existe una correlación directa con las selectinas, las integrinas y otros receptores, que afecta a las interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales (Jeong y col. 2012). La fermentación de los prebióticos por las bacterias del intestino genera ácidos grasos de cadena corta, que tienen un efecto antiinflamatorio directo y promueven la integridad de la barrera intestinal a través de sus efectos sobre la proliferación y la diferenciación de las células de la mucosa intestinal (Wong y col. 2006; Malowski y col. 2009).

1.1.4. Grasas.

La fracción lipídica supone el 3,5-4,5% de la leche humana, es su principal componente energético y es el componente más variable, ya que depende en gran medida de la dieta consumida por la madre y del tiempo de lactancia. Las células alveolares de la mama producen glóbulos grasos que contienen predominantemente triglicéridos y pequeñas cantidades de monoglicéridos, diglicéridos, y ácidos grasos no esterificados, rodeados por una membrana grasa con colesterol esterificado, fosfolípidos, polipéptidos glicosilados, filamentos, mucinas, lactaderina y otros componentes (tabla 1-5). Estos lípidos intervienen en la modulación de la función gastrointestinal, en el metabolismo de las lipoproteínas y en la composición y función de las membranas celulares entre otras funciones, que afectan de forma importante al crecimiento, el desarrollo y la salud del lactante.

Tabla 1-5. Composición lipídica de la leche humana.

| | Lípidos totales % | Media mg/100 g (mínimo-máximo) |
|---------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|
| Triglicéridos | 98.1–98.8 | |
| Diglicéridos | 0.01–0.7 | |
| Monoglicéridos | Trazas | |
| Ácidos grasos no esterificados | 0.08–0.4 | |
| Fosfolípidos | 0.26–0.8 | 23.8 (10.4–38.4) |
| Fosfatidilinositol | | 1.1 (0.9–2.3) |
| Fosfatidilserina | | 1.4 (1–1.9) |
| Fosfatidiletanolamina | | 6.8 (1.98–11.8) |
| Fosfatidilcolina | | 6.0 (1.98–9.6) |
| Esfingomielina | | 8.5 (2.7–14.6) |
| Colesterol | 0.25–0.34 | |

Tomado de Delplanque y col. 2015.

La leche humana tiene un alto contenido en colesterol.

La leche humana contiene 90-150 mg/l de colesterol (Delplanque y col. 2015). El colesterol es necesario para el desarrollo cerebral del recién nacido, ya que es una grasa que se requiere en la proliferación de las neuronas y en la mielinización de las células gliales (Akrê y col. 1994; Lawrence y col. 2007). Además, favorece la constitución y especialización de enzimas como la hidroximetil-glutaril- CoA-reductasa hepática y la 7 α -hidroxilasa biliar, así como los receptores de lipoproteínas (Demmers y col. 2005), lo que durante la infancia se traduce en concentraciones séricas elevadas de colesterol total y lipoproteínas de baja densidad (LDL) que podrían influir sobre la diferenciación, proliferación y distribución de adipocitos en la vida adulta (Fall y col. 1992; Hanosh y col. 1988; Owen y col. 2002). Los lactantes alimentados al pecho muestran una síntesis de colesterol 3 veces más baja que los lactantes alimentados con fórmula láctea (Wong y col. 1993), lo que podría sugerir que la ingesta de colesterol, junto con otros factores, puede modular el metabolismo del colesterol en los lactantes; estos efectos parecen desaparecer a partir de los 18 meses de edad (Bayley y col. 2002; Demmers y col. 2005). Se ha sugerido que esta mayor concentración sanguínea de colesterol podría constituir un factor de protección contra la enfermedad coronaria aterosclerosa (Rich-Edwards y col. 2004; Owen y col. 2008).

La estructura de los triglicéridos de la leche humana favorece la absorción de la grasa por el lactante.

Los triglicéridos constituyen el 98% de la grasa de la leche humana. Hay estudios que indican que a pesar de la reducida actividad de la lipasa pancreática durante las primeras semanas de vida, la reacción limitante de la digestión de la grasa no es la hidrólisis de los triglicéridos, sino la solubilización de los ácidos grasos saturados de larga cadena (Watkins, 1975). La digestión y la absorción de los triglicéridos son mejores cuando los ácidos grasos saturados de larga cadena, principalmente el ácido palmítico (16:0), se encuentran en la posición interna (sn-2) del triglicérido (Innis, 2011). Esto se debe a que las lipasas hidrolizan principalmente las posiciones externas y el ácido graso de la posición sn-2 se absorbe como 2-monoglicérido y no como ácido graso libre. Esta es la principal razón por la que la grasa de la leche humana se absorbe mejor que la procedente de la leche de vaca. En la leche humana, el 75% del ácido palmítico se encuentra en la posición sn-2 del triglicérido (figura 1-3, figura 1-4), mientras que en la leche de vaca el ácido palmítico se encuentra distribuido al azar en las tres posiciones (Dotson y col. 1992; López-López y col. 2002; Abrahamse y col. 2012).

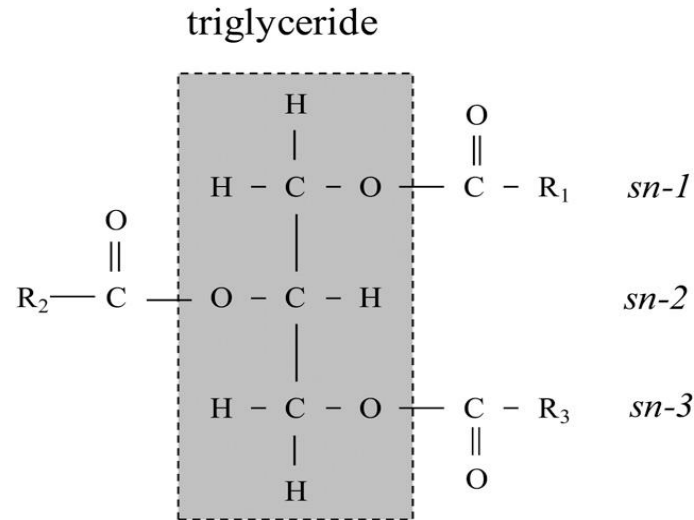


Figura 1-3. Esquema de la estructura del triglicérido. R, ácido graso; R1, R2, y R3 indican los ácidos grasos en las posiciones sn-1, sn -2 y s-3, respectivamente. (Tomado de Innis, 2011).

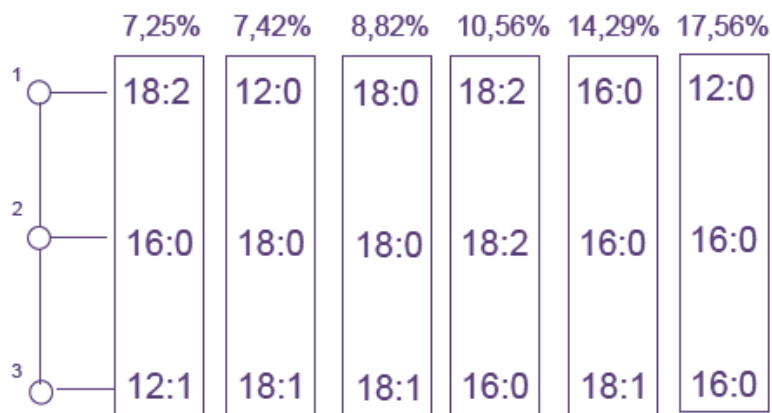


Figura 1-4: Triglicéridos más frecuentes en la leche materna (% respecto al total). (Adaptado de Dotson y col. 1992).

La leche humana como fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL).

La leche humana aporta ácidos grasos de cadena larga (AGPI-CL) cuyos precursores son el ácido α -linolénico (ALA, 18:3n-3) y el ácido linoleico (LA, 18:2n-6). Estos ácidos grasos, conocidos como ácidos grasos esenciales ya que no pueden ser sintetizados *de novo* por el ser humano y deben provenir de la dieta, se convierten en AGPI-CL, tales como el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3), vital en el desarrollo estructural y funcional de los sistemas visual-sensorial, perceptual y cognitivo del lactante (Hamosh y col. 1998), y el ácido araquidónico (AA; 20:4n-6), útil como sustrato para la síntesis de

eicosanoides como las prostaglandinas, los leucotrienos y los tromboxanos, que modulan las respuestas inflamatoria e inmune al activar la proliferación de linfocitos y células NK, y la producción de citoquinas y de IgE en las células inflamatorias (Calder, 2003). En el curso de la lactación, el contenido de AGPI-CL en la leche humana varía de forma significativa: LA y ALA aumentan un 8% y 38%, respectivamente, mientras que AA y DHA descienden un 32% y 52%, respectivamente (Delplanque y col. 2015).

Los ácidos grasos de la leche humana se derivan de la síntesis endógena en la glándula mamaria y de la absorción desde el plasma materno; ambos procesos se ven influidos por la nutrición materna (Innis, 2013). La diferente ingesta de alimentos marinos explica perfectamente el contenido en AA y DHA de la leche humana (Brenna y col. 2009), ya que una mínima parte de los AGPI-CL derivan de la síntesis endógena, la cual depende a su vez de los polimorfismos genéticos de las desaturasas de los ácidos grasos (Lattka y col. 2011). La leche de las mujeres lactantes que consumen dietas veganas o vegetarianas tiene un 0,1% de DHA, mientras que sube hasta 0,8% cuando es alta la ingesta de pescado y otras fuentes de DHA (Innis, 2014). El aumento del 100% en LA a partir de los niveles promedio de 6-7% a 13-18% de ácidos grasos en la leche humana en los países occidentales durante los últimos 30-50 años, corrobora que los ácidos grasos insaturados de la leche humana reflejan la calidad de ácidos grasos de la dieta de la madre en periodo de lactancia.

Se ha demostrado que los AGPI-CL, principalmente AA (0,44 g/100 g de grasa) y DHA (0,30 g/100 g de grasa), que aporta la leche humana tienen su importancia para el desarrollo cerebral y de la retina en el recién nacido (Hamosh y col. 1998). Estos ácidos grasos no son esenciales para el adulto que puede sintetizarlos a partir de LA y ALA presentes normalmente en la dieta. Sin embargo, el lactante tiene esta capacidad reducida y de ahí la importancia del aporte de estos AGPI-CL por la leche de la madre (Koletzko y col. 1999). Existen datos que indican una actividad desaturasa adecuada en los recién nacidos y lactantes pequeños, que podrían sintetizar suficiente DHA, aunque es posible que exista alguna dificultad en la elongación de las cadenas (Innis, 2014).

El DHA representa aproximadamente 10% de los ácidos grasos del cerebro humano, cantidad que puede llegar a ser del 35% de los ácidos grasos de los fosfolípidos de las sinapsis neuronales (Innis, 2007) y su concentración también es alta en los segmentos externos de los fotorreceptores de la retina donde participa en la transducción de la señal visual (Innis, 2014). El DHA está presente en el cerebro

junto con grandes cantidades de AA y ácido adrenico (22:4n-6), aunque el cerebro tiene cantidades muy bajas de LA, ALA, y ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) (Innis, 2007). Los estudios de autopsias realizados antes de la adición de DHA y AA a las fórmulas infantiles, mostraron un contenido menor de DHA y más alto de ácido adrenico y ácido docosapentaenoico (22:5n-6) en el cerebro de los lactantes humanos que fueron alimentados con fórmula en comparación con los cerebros de los bebés que fueron amamantados (Makrides y col. 1994; Farquharson y col. 1995). Se ha comunicado que el coeficiente intelectual, el neurodesarrollo y la agudeza visual de los niños es mayor en aquellos que han sido lactados al pecho, y este beneficio se atribuye a la presencia de DHA (Jensen CL y col. 2010; Makrides y col. 2010; Campoy y col. 2012); sin embargo, otros trabajos no han encontrado efectos del aumento de DHA en la leche humana sobre el desarrollo neurológico infantil y la agudeza visual en lactantes nacidos a término, ni a corto ni a largo plazo (Gibson y col. 1997; Jensen y col. 2005; Cheatham y col. 2011) y los metaanálisis realizados no han podido demostrar estos beneficios (Simmer y col. 2011; Delgado-Noguera y col. 2010). Es posible que las diferentes dosis y fuentes de los suplementos de DHA administrados a las madres durante la gestación y durante el período de lactación, así como el tiempo que duró la referida suplementación en los diferentes estudios, pueda influir en la disparidad de los resultados sin olvidar que otros nutrientes, como el yodo (Bath y col. 2013), también tienen una importancia crítica para el desarrollo neurológico infantil.

La leche humana contiene otros AGPI-CL en bajas concentraciones, como ocurre con el EPA, que tiene actividad antitrombótica y es precursor de metabolitos con propiedades antitrombóticas, el ácido docosapentaenoico y el ácido estearidónico (SDA, 18:4n-3)(Delplanque y col. 2015). El SDA actúa como precursor del EPA y DHA en el metabolismo humano y la tasa de conversión de SDA en EPA y DHA resulta ser mucho más elevada que la del ALA (Rincón MA y col. 2015). Se ha examinado la proporción presente de las concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados n-3 y n-6 en la leche humana, y si el que existiera una mayor proporción de unos u otros afectaba a la ganancia de peso en el niño lactante; no se encontró diferencia alguna (Scholtens y col. 2009)

Gangliósidos.

Los gangliósidos son esfingolípidos que contienen uno o más residuos de ácido siálico y su contenido y distribución en la leche humana cambian durante la lactancia (Rueda y col. 1996), lo que sugiere que los gangliósidos pueden participar en los procesos fisiológicos que tienen lugar en el

desarrollo temprano del lactante (Rueda y col. 1998a). Se conoce que los gangliósidos intervienen en el crecimiento, la migración y la maduración del tejido nervioso, en la formación de sinapsis, en la mielinización y en los procesos de transmisión nerviosa y se cree que pueden actuar como sustratos en la formación de las capas nerviosas que generan las más altas funciones cognitivas en el cerebro (Rösner, 2003; McJarrow y col. 2009). Se ha demostrado que el cerebro de los lactantes alimentados con leche humana contiene una mayor cantidad de gangliósidos que el cerebro de los alimentados con fórmula láctea (Wang y col. 2003), y que la leche humana contiene mayor cantidad de gangliósidos que las fórmulas lácteas (Pan y col. 2000; McJarrow y col. 2009). De hecho, el ácido siálico, un componente esencial de los gangliósidos cerebrales y de las proteínas sialicadas, se encuentra en grandes cantidades en la leche humana, predominantemente como ácido N-acetil-neuramínico (Wang, 1012), mientras que es escaso en las fórmulas lácteas. Recientemente se ha comunicado que los lactantes alimentados con fórmulas lácteas suplementadas con gangliósidos, presentan a los 6 meses de vida un mejor desarrollo cognitivo que los alimentados con fórmula estándar, así como una mejor coordinación de manos y ojos, y un mayor rendimiento y coeficiente intelectual; los autores no encontraron diferencias respecto a un grupo control alimentado con leche humana (Gurnida y col. 2012).

GM1, un gangliósido presente en la leche humana, tiene la capacidad de unirse a las toxinas de *E. coli* y *Vibrio cholerae* e inhibir su acción (Rueda, 2007), por lo que puede contribuir a la protección del lactante frente a estas infecciones. Se ha comunicado que la adición de gangliósidos a una fórmula láctea en cantidades semejantes a la leche humana dio lugar a un descenso de *E. coli* y a un aumento de bifidobacterias en las heces de recién nacidos prematuros (Rueda y col. 1998b). Es posible que los gangliósidos puedan estar involucrados en la activación de las células T y en la diferenciación de distintas subpoblaciones linfocitarias (Rueda, 2007). Por tanto, la suplementación de las fórmulas lácteas con gangliósidos, especialmente con GD3, podría contribuir sustancialmente en el proceso de proliferación, activación y diferenciación de las células inmunes intestinales en el recién nacido. Estudios llevados a cabo en ratones al destete pusieron de manifiesto que los gangliósidos de la dieta estimulaban el desarrollo temprano de las células secretoras de citoquinas (Th1 y Th2) en la lámina propia y en las placas de Peyer del intestino (Vázquez y col. 2001), incrementaban el número de células intestinales productoras de IgAs (Vázquez y col. 1999) y aumentaban la concentración de IgAs en la luz intestinal (Vázquez y col. 2000).

1.1.5. Minerales y oligoelementos.

El contenido total de minerales de la leche humana es constante e incluye: sodio, potasio, cloro, calcio, magnesio y fósforo, así como trazas de hierro, cinc, cobre, manganeso, selenio y yodo. Varios estudios han demostrado la alta biodisponibilidad de los minerales de la leche humana y su relación con otros componentes que facilitan su absorción, metabolismo y excreción (Picciano y col. 1998). La alta biodisponibilidad compensa la baja concentración de ciertos minerales como el calcio y el cinc, cuyo contenido en leche humana, a pesar de ser bajo, satisface las necesidades de los niños nacidos a término. La relación calcio/fósforo de la leche materna es de 1,2 a 2; esto favorece la absorción de hasta el 75% del calcio, y esto influye de una forma importante sobre la formación del tejido óseo en el lactante (Abrams, 2006). El cinc es parte de los sistemas activadores de las enzimas; su concentración en la leche humana es de 2 a 4 mcg/ml y tiene una elevada biodisponibilidad: 45 a 58% de la fracción sérica de las proteínas (Lönnerdal y col. 2009). A pesar de que el contenido en hierro es bajo en la leche humana, no suelen producirse deficiencias en el lactante debido principalmente a su mayor absorción facilitada por la presencia de la vitamina C, así como por los bajos niveles de proteínas y de fósforo. Se absorbe entre 45 y 75% de su contenido total, posiblemente debido a que el hierro en la leche humana se encuentra unido a las seroproteínas en el 65 al 81% y una baja cantidad (2 a 14%) unido a la caseína que, al tener un paso lento por el estómago, sufre una mayor degradación (Lönnerdal y col. 2009). El flúor, a pesar de su baja cantidad en leche materna, es útil para evitar las caries, lo cual es evidente si se compara a los niños alimentados al pecho materno con los alimentados con biberón (Lawrence y col. 2007).

1.1.6. Vitaminas.

Todas las vitaminas hidrosolubles están presentes en la leche humana y, aunque tiene una concentración óptima, se han descrito algunas deficiencias de vitamina B₁₂ en lactantes de madres vegetarianas (Rodríguez-Palermo y col. 1999). En cuanto a las vitaminas liposolubles, el contenido en vitaminas A y E es adecuado en la leche humana (Allen, 2005). Sin embargo, pueden producirse deficiencias de vitamina K (Greer, 1999), sobre todo en los primeros días tras el nacimiento, durante los cuales la producción endógena por las bacterias entéricas es muy baja. También es baja la concentración de vitamina D (Taylor y col. 2008), lo que podría suponer un problema debido a la escasa exposición solar de los lactantes. Sin embargo, los lactantes alimentados con leche humana no padecen raquitismo,

ya que sí poseen un sulfato de esa vitamina, adquirido por vía transplacentaria, que tiene actividad durante los primeros 3 meses de la vida (García-López, 2011).

1.1.7. Poliaminas.

Las poliaminas (putrescina, espermidina, espermina y agmatina) son un grupo de compuestos nitrogenados presentes en todas las células del organismo. Proviene de la síntesis endógena, de su ingesta con los alimentos y de su producción en el intestino como compuestos derivados del metabolismo bacteriano (Larqué y col. 2007). Las poliaminas están presentes en la leche humana en cantidades importantes, principalmente espermina y espermidina, pero su papel en la nutrición del neonato no está del todo establecido. Su contenido en la leche humana cambia durante la lactancia, pudiendo llegar a ser las concentraciones de espermina y espermidina hasta 10 veces superiores a la inicial (Bust y col. 1995). Estos compuestos son buenos marcadores del desarrollo y proliferación intestinal y existen estudios que sugieren un efecto trófico directo sobre las células intestinales inmaduras, mejorando la permeabilidad de la mucosa (Bust y col. 1993). Al favorecer la maduración de los enterocitos, estos compuestos mejoran la permeabilidad intestinal, lo cual implica un menor paso de alérgenos alimentarios y una protección frente al desarrollo de alergia alimentaria (Dandriofosse y col. 2000).

1.1.8. Componentes inmunológicos de la leche humana.

La leche humana no sólo aporta al recién nacido los nutrientes que necesita para su correcto desarrollo, sino que además aporta una serie de componentes bioactivos que confieren a la lactancia importantes ventajas. Así, la leche humana tiene componentes que le confieren efectos antiinfecciosos, antiinflamatorios e inmunomoduladores, que le permiten proteger al lactante de diversas patologías (Jeurink y col. 2013).

1.1.8.1. Protección frente a infecciones gastrointestinales y respiratorias.

Existen evidencias de que la leche humana protege al niño contra numerosas infecciones a las que está expuesto durante el primer año de vida (Field, 2005; Lawrence y col. 2007). Los niños que no han sido alimentados al pecho tienen una probabilidad 17 veces mayor de ser hospitalizados por neumonía que aquellos que han sido amamantados; esta probabilidad es aún mayor para niños menores de 3 meses (César y col. 1999). Existen estudios que sugieren que el riesgo de muerte por

diarrea aumenta 14,2 veces en niños no amamantados (Victoria y col. 1987) y que los niños que no toman lactancia materna tienen un riesgo hasta 9 veces mayor de padecer diarrea (Lamberti y col. 2011; Strand y col. 2012). Asimismo, la lactancia materna ha sido relacionada con una menor incidencia de otitis media, infecciones urinarias y meningitis causada por *Haemophilus influenzae* (Nascimento y col. 2003).

El recién nacido es incapaz de desarrollar su propia respuesta inmunitaria local para proteger su mucosa intestinal, uno de los primeros lugares que van a entrar en contacto con los antígenos presentes en la leche y el ambiente. La protección pasiva de la mucosa intestinal del niño en su primera etapa después del nacimiento depende en gran medida de componentes inmunitarios contenidos en la leche materna (Hosea Blewett y col. 2008). Esta inmunidad está estrechamente ligada al intestino materno y al circuito enteromamario: el sistema inmunitario maduro de la madre transfiere a la leche materna células activadas e inmunoglobulinas que se transmiten directamente al bebé protegiéndole frente a patógenos (Figura 1-5).

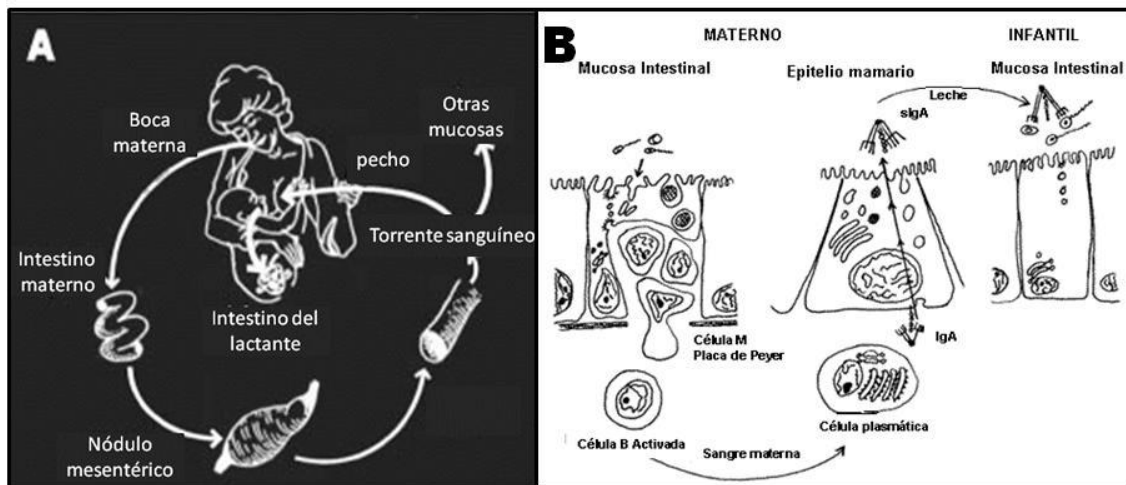


Figura 1-5. Transferencia de inmunidad de la madre al lactante. A: órganos, y B: mucosas implicadas. Tomado de Newburg y col. 2007.

Durante la lactancia se desarrolla y se activa en el lactante el tejido linfóide relacionado con las mucosas en el intestino (GALT), los pulmones, las glándulas mamarias, las glándulas salivales y lagrimales, y las vías genitourinarias. Este proceso se realiza a través del **eje entero-mamario** (Newburg, 2007; García-López, 2011). Cuando la madre ingiere antígenos bacterianos, virales y otros, llegan al intestino y en el segmento terminal del íleon, donde se encuentra el GALT, son capturados por las

células M y transportados a las placas de Peyer. Aquí se encuentran las células dendríticas que presentan los antígenos a los linfocitos T, cuya respuesta es la secreción de determinadas citoquinas, entre las que destaca el factor de crecimiento transformador β , (TGF- β), implicadas en la diferenciación de las células B a células productoras de IgA específica para ese antígeno determinado. Las células B emigran por los ganglios linfáticos regionales del mesenterio y llegan al conducto torácico, donde se dividen en tres compartimentos: las glándulas mamarias, los tejidos linfáticos del intestino materno y el sistema bronquial. En estas regiones anatómicas maduran y se transforman en células plasmáticas productoras de IgA. Inicialmente las IgA son monómeros y en las células epiteliales de las glándulas exocrinas (mama, lagrimal, salival), los sistemas respiratorio, digestivo y urinario, se unen en pares con la cadena J para formar el dímero de IgA; se fijan a las glicoproteínas (componente secretor) para resistir y protegerse de la digestión enzimática y están listas para ser transportadas a través de las células epiteliales y aparecer en las secreciones exocrinas en la superficie las membranas mucosas. Las IgA producidas por las células plasmáticas en los puntos efectores son transportadas activamente a través de las células epiteliales de la glándula mamaria, liberándose a la leche materna el complejo denominado IgAs.

Otro papel que pueden jugar estas células (células dendríticas, macrófagos, etc.) es el de transportar bacterias comensales (Martín y col. 2004). En este sentido, Pérez y col (2007) observaron mediante microscopía la asociación de bacterias a células mononucleares en muestras de leche y sangre de madres lactantes. Estas bacterias que transporta la leche serían una fuente importante de microorganismos para la colonización del intestino neonatal, además de formar parte de la educación del sistema inmune neonatal para diferenciar entre antígenos propios, antígenos procedentes de la dieta, organismos comensales y posibles patógenos (Martín y col. 2003; Pérez y col 2007).

Los componentes inmunológicos de la leche materna como responsables de la actividad antiinfecciosa.

La composición inmunológica de la leche materna es en gran medida responsable de su papel antiinfeccioso. Dichos componentes inmunológicos pueden dividirse en celulares y humorales, pudiendo ser a su vez específicos y no específicos (figura 1-6). Los elementos celulares están constituidos principalmente por macrófagos, células T, células madre y linfocitos presentes en alto número en las primeras etapas de la lactancia (Ballard y col. 2013).

- **Macrófagos:** son componentes celulares no específicos y los más abundantes en la leche humana (80-90%). Tienen capacidad fagocítica, lo que les confiere propiedades bactericidas y fungicidas, y tienen capacidad de distinguir las células dendríticas que estimulan la actividad de las células T en el lactante (Ichikawa y col. 2003) y le provee de protección frente a los microorganismos patógenos mientras estimula el desarrollo del sistema inmunológico. Además los macrófagos sintetizan algunos componentes de defensa humorales, como C3 y C4, lisozima y lactoferrina (Xanthou, 1998).

- **Linfocitos:** representan el 5-10% del total de glóbulos blancos (Riordan J y col. 2009). Se encuentran principalmente linfocitos T, con actividad citotóxica frente a microorganismos. En menor número existen linfocitos B, responsables de la síntesis de anticuerpos específicos frente a numerosos patógenos.

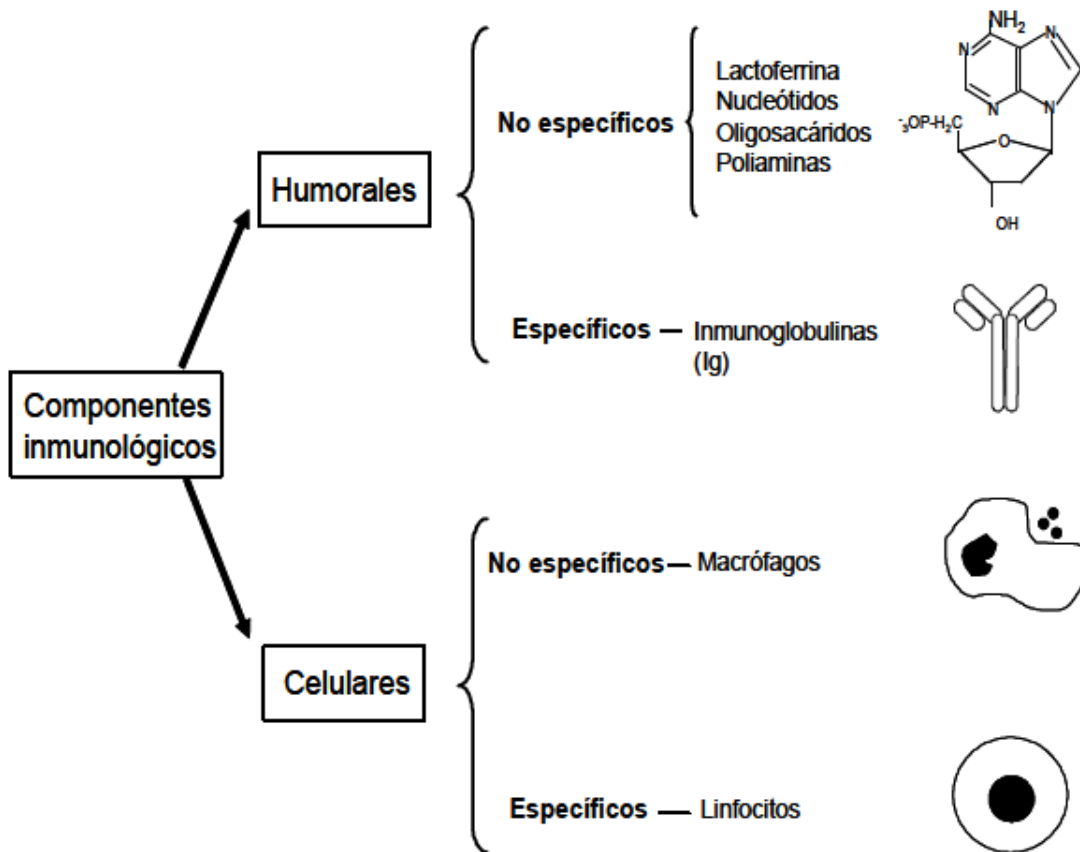


Figura 1-6. Componentes inmunológicos de la leche humana.

Sobre los elementos de defensa humorales no específicos, como **lactoferrina**, **oligosacáridos**, nucleótidos o **gangliósidos** ya se ha hecho referencia con anterioridad como componentes con actividad protectora frente a infecciones. La **lactaderina**, una glicoproteína, tiene la capacidad de prevenir la infección por rotavirus en el recién nacido (Newburg y col. 1998), favorece la curación del intestino inflamado (Kusunoki y col. 2012) y la expresión de un fenotipo tolerogénico en los macrófagos y células dendríticas intestinales (Baghdadi y col. 2012), lo cual es muy importante para mantener la salud del tubo digestivo. Las **mucinas** presentes en el glóbulo graso de la leche (MUC1 y MUC2) también desempeñan una función protectora frente a las infecciones en el lactante (Ruvoen-Clouet y col. 2006; Liu y col 2012), así como la **lipasa estimuladora de sales biliares** que contribuye a proteger al lactante frente a las infecciones virales (Ruvoen-Clouet y col. 2006).

Dentro de los elementos humorales específicos de la leche humana se encuentran **citoquinas**, **factores de crecimiento** y, principalmente, **inmunoglobulinas**. Cualquier patógeno que amenaza a la madre estimula la producción de estos anticuerpos específicos, que son secretados a la leche de la madre y, a través de ella, llegan al recién nacido protegiéndolo de microorganismos patógenos. La principal inmunoglobulina de la leche humana es la IgAs, que proviene en parte del suero y en parte de la síntesis en la glándula mamaria, llegando a alcanzar una concentración de 60 mg/ml en el calostro. Esta IgAs, que es estable a valores de pH bajos y resistente a la acción de enzimas proteolíticas, confiere protección al intestino del recién nacido frente a infecciones (Lawrence y Lawrence, 2007). La trascendencia protectora de la leche materna a nivel de mucosas como la boca, la nariz y el oído del lactante, se debe a la IgAs que previene de la adhesión de microorganismos a la pared intestinal del lactante, además de actuar frente a diversos agentes infecciosos como rotavirus, *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Shigella*, *Salmonella*, *Clostridium difficile*, *Giardia lamblia* y *Campylobacter* (Nascimento y col. 2003; Hosea Blewett y col. 2008). Existen otras inmunoglobulinas presentes en la leche humana como IgD, IgE, IgG e IgM que participan en la respuesta inmune a nivel de la glándula mamaria y son importantes para la protección inicial del neonato frente a las infecciones maternas (Hurley y col. 2011).

Las citoquinas de la leche humana pueden atravesar la barrera intestinal y entrar en contacto con las células para influir sobre la actividad inmunológica. Estas citoquinas pueden subdividirse en proinflamatorias o de defensa frente a la infección y antiinflamatorias (Garofalo, 2010; Ballard y col. 2013). TGF- β constituye el grupo de citoquinas más abundante de la leche humana e intervienen en la

regulación de la inflamación y la reparación de heridas, y participan en la prevención de las enfermedades alérgicas al favorecer la tolerancia en el tracto intestinal. El factor estimulante de los granulocitos del colon, también presente en la leche humana (Gilmore y col. 1994), tiene efectos beneficiosos sobre el desarrollo intestinal y el tratamiento de la sepsis (Ballard y col. 2013). Otras citoquinas presentes en la leche humana son: IL-10, IL-7 que atraviesa la pared intestinal e influye sobre el desarrollo del timo; y TNF- α , IL-6, IL-8 y IFN γ que son factores proinflamatorios (Ballard y col 2013). En las mastitis se detectan concentraciones elevadas de IL-6 e IL-8 limitadas solamente a los lóbulos afectados (Mizuno y col. 2012; Hunt y col. 2013).

La leche humana favorece una microbiota intestinal protectora.

En el momento del parto, el tracto gastrointestinal del recién nacido es colonizado por las bacterias fecales y vaginales de la madre y de las existentes en el medio ambiente. Un hallazgo constante es que todos los recién nacidos inicialmente son colonizados por *E. coli* y estreptococos, responsables del consumo de oxígeno presente en la luz intestinal y de la creación de un ambiente favorable para el establecimiento de los anaerobios (bifidobacterias, lactobacilos, bacteroides y clostridios) entre los 4-7 días de vida (Thompson-Chagoyan y col. 2007). Durante la primera semana de vida existe en el intestino un aumento en el recuento total bacteriano y un aumento paulatino de los anaerobios estrictos. El tipo de alimentación del recién nacido influye de una manera muy determinante sobre la colonización intestinal: bifidobacterias, lactobacilos y cocos Gram positivos predominan en las heces de los lactados al pecho, mientras que el recuento de bifidobacterias es menor y predominan bacteroides, clostridios y coliformes en las heces de los neonatos alimentados con fórmula láctea (Fallani y col. 2010). Se ha sugerido que las diferencias en la composición de la microbiota intestinal del recién nacido en función del tipo de alimentación, podrían ser las responsables de los efectos protectores de la lactancia materna (Wallace y col. 2011).

El sistema inmune es inmaduro al nacimiento y se desarrolla tras la exposición a la microbiota intestinal, la cual lo sensibiliza en el sentido de promover la liberación de moléculas de señal, a través de las cuales se inicia una respuesta inmune (Didierlaurent y col. 2001). La relación entre el sistema linfático asociado al intestino y la microbiota intestinal en etapas tempranas de la vida, es crucial para el desarrollo apropiado de las interacciones entre los distintos tipos celulares de la mucosa y la inmunorregulación sistémica (Guarner y col. 2003). Se ha comprobado que los animales con intestino

estéril son altamente susceptibles a las infecciones, lo que provee una evidencia de que la microbiota intestinal debe ser considerada como una importante barrera de defensa (Wallace y col. 2011).

Uno de los componentes más importantes de la leche humana es su microbiota. La leche humana constituye una fuente continua y excelente de bacterias comensales para el intestino del recién nacido (Martin y col. 2003). Entre estas bacterias se encuentran especies con potentes actividades inmunomoduladoras y antibacterianas que podrían ejercer un papel clave en la reducción de las infecciones del lactante (Lara-Villoslada y col. 2007a). Los niños amamantados tienen una microbiota intestinal más favorable que los niños alimentados con fórmula, tanto por la presencia de bacterias ácido-lácticas en la leche de la madre, como por diferentes compuestos que favorecen el crecimiento de estas bacterias. Dichas bacterias colonizan la mucosa intestinal del lactante de forma competitiva, impidiendo la adhesión de patógenos gastrointestinales. Asimismo, se establece una competencia por los nutrientes que impide el crecimiento de estos patógenos (Conway, 1995). Diferentes estudios muestran que lactobacilos y bifidobacterias ejercen un efecto antagonista del crecimiento de patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* y *Clostridium perfringens* (Gilliland y col. 1977; Ozbas y col. 1995). Esta actividad antagonista se ha demostrado para bacterias originariamente presentes en la leche materna (Olivares y col. 2006a).

Otro mecanismo antimicrobiano de las bacterias ácido-lácticas es la producción de determinadas sustancias que dificultan el crecimiento de otros microorganismos perjudiciales (Laroia y col. 1990): a) ácidos orgánicos como el ácido láctico o el acético, que disminuyen el pH y favorecen el peristaltismo creando un ambiente desfavorable para los patógenos; b) peróxido de hidrogeno que oxida el tiocianato dando ácido hidrocianico, también perjudicial para estos microorganismos; y c) bacteriocinas (nisina, lactobrevina, acidofilina, acidolina, etc.), sustancias con una actividad antimicrobiana específica.

1.1.8.2. Modulación de la respuesta inmunológica del lactante.

La leche humana puede modular la respuesta inmunológica del lactante a través de componentes inmunomoduladores y antiinflamatorios entre los que destacan prolactina, lactoferrina, nucleótidos y citoquinas (Grazioso y col. 1997). Estos componentes tienen la capacidad de regular la

maduración del sistema inmunológico del lactante, favoreciendo la proliferación de linfocitos, la síntesis de inmunoglobulinas y la actividad celular.

Hasta la fecha, no se ha demostrado *in vivo* una actividad antiinflamatoria directa de la leche humana, pero estudios epidemiológicos sugieren que los niños amamantados están protegidos frente a infecciones, sin la observación de lesiones de la mucosa intestinal o respiratoria debidas a una respuesta inflamatoria (Garofalo y col. 1999). Probablemente, este es el resultado de un sistema antiinflamatorio muy bien regulado de la leche humana. Los factores antiinflamatorios incluyen proteasas, interleuquinas, prostaglandinas, acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas, IgAs y antioxidantes como vitaminas y peroxidasas. Las hormonas y factores de crecimiento también juegan un papel clave en este sentido, promoviendo la maduración intestinal y el desarrollo del sistema inmunológico del lactante (Garofalo y col. 1999).

La microbiota intestinal y el equilibrio del sistema inmunológico.

Bacterias aisladas de la leche humana han demostrado tener efectos inmunomoduladores y antiinfecciosos, por lo que estas bacterias podrían ser responsables de algunas de las ventajas señaladas para la lactancia natural (Olivares y col. 2008). Algunos de los lactobacilos aislados de la leche humana (Olivares y col. 2006a), han demostrado su capacidad para competir con las bacterias enteropatógenas por los nutrientes y por los receptores de unión en el epitelio intestinal, y aumentar las funciones de barrera intestinal gracias a inducir un incremento en la producción de mucina y una reducción de la permeabilidad intestinal. Cepas de lactobacilos y bifidobacterias han demostrado su capacidad para estabilizar la integridad de la barrera intestinal (Rosenfeldt y col. 2004), reduciendo potencialmente la carga sistémica de antígenos, e influenciar la función inmune a través de los efectos sobre enterocitos, células presentadoras de antígeno (monocitos y células dendríticas), células T reguladoras (Treg) y células T y B efectoras (Prescott y col. 2007; Bermúdez-Brito y col. 2012). Las células dendríticas del intestino interactúan con las bacterias presentes en la luz intestinal e intervienen en la respuesta de tolerancia o respuesta inmune frente a las mismas, mediante la regulación de la diferenciación de las células T en Th1, Th2, Th17 o células Treg. Diversos tipos de células Treg, tales como Th3, T_R1, CD4⁺ y CD25⁺ regulador, CD8⁺ supresor y las células T $\gamma\delta$, pueden ser influenciadas por las bacterias presentes en el intestino. Ya que estas células reguladoras desempeñan un papel significativo en la respuesta inmune,

determinadas bacterias pueden ejercer sus efectos antiinflamatorios a través de su acción moduladora sobre las mismas.

Por otro lado, se ha descrito que las diferencias de la microbiota intestinal preceden al desarrollo de atopia, y el hallazgo característico es una descenso en la relación bifidobacterias/clostridios (Björkstén y col. 2001). En este sentido, se ha referido que la administración de determinadas bacterias del género *Lactobacillus* a los lactantes supone una reducción de la incidencia de fenómenos alérgicos (Kalliomaki y col. 2001).

La leche humana y la respuesta a vacunas.

La acción de la leche humana sobre el sistema inmunológico del lactante también podría explicar la mejor respuesta de éste frente a determinadas vacunas. Así, diferentes estudios encuentran una mayor producción de anticuerpos en niños amamantados y vacunados frente a la poliomielitis, tétanos y difteria (Hahn-Zoric y col. 1990; Pickering y col. 1998).

1.2. LACTANCIA ARTIFICIAL.

Cuando por la circunstancia que fuere se toma la decisión de no amamantar, se utilizan para la alimentación del lactante fórmulas lácteas generalmente derivadas de la leche de vaca. La intención ha sido en todo instante la de lograr un alimento que fuera lo más parecido posible a la leche humana, por considerarla como el nutrimento óptimo para el niño en los primeros meses de la vida. Los progresos en el conocimiento de la composición de leche humana y de las necesidades nutricionales del lactante, junto con la disponibilidad de medios industriales cada vez más perfectos, permiten disponer hoy de una variada gama de preparados para la alimentación artificial del lactante.

1.2.1. Estudio comparativo entre las leches de mujer y de vaca (Mataix y col. 2009; Maldonado y col. 2010).

En las tablas 1-6 y 1-7 se recogen las diferencias de composición entre la leche humana y la leche de vaca.

| Tabla 1-6 Diferencias en macronutrientes entre la leche humana y la leche de vaca | | |
|--|--|---|
| | <i>Leche humana</i> | <i>Leche de vaca</i> |
| Hidratos de Carbono | 6-7 g/100 ml Lactosa Lactooligosacáridos | 4-5 g/100 ml Lactosa |
| Proteínas y nitrógeno | 0,9-1,1 g/100 ml Predominan proteínas del suero Proteínas de defensa Nitrógeno no proteico | 3,3-3,5 g/100 ml Predomina caseína y β -lactoglobulina |
| Grasas | 4,2 g/100 ml Alto contenido en colesterol y en ácidos oleico, α -linolénico, linoleico, docosahexanoico y araquidónico | 3,8 g/100 ml Predominan los ácidos grasos saturados Ácidos grasos de cadena corta |
| Minerales | 0,2 g/100ml Calcio/fósforo = 2/1 Alta biodisponibilidad del hierro | 0,7 mg/100 ml Alta carga renal de solutos |

Tomado de Maldonado y col. 2010

Energía.

La densidad calórica es similar (70 kcal/100 ml); sin embargo cuando se analiza su composición química se observan diferencias notables.

Proteínas.

La leche de vaca tiene un contenido proteico (3,3-3,5 g/dl) tres veces superior al de la leche humana (0,9-1,1 g/dl). Sin embargo, es evidente que el alto valor proteico de la leche de vaca no tiene un significado útil en cuanto al niño se refiere. Todo lo contrario, su presencia supone un mayor esfuerzo digestivo, con el consiguiente riesgo de un disturbio gastrointestinal, al tiempo que para su metabolismo implica una sobrecarga renal. Importante es reconocer que las diferencias entre una y otra no se limitan a un problema de cantidad, sino también de calidad: en la leche de vaca predomina la caseína (82/18) y en la humana las proteínas del suero (40/60 en leche madura y 50/50 en leche hipermadura o de lactancia avanzada), siendo su principal componente la α -lactoalbúmina, una de las proteínas del sistema lactosa sintetasa que asegura la síntesis de lactosa en la glándula mamaria. Por su

gran cantidad de caseína, la leche de vaca se coagula en el estómago de modo grosero, en grandes grumos que, por esta circunstancia, son difícilmente atacados por las secreciones gástricas, al ofrecer poca superficie para la actuación de aquellas. Por otra parte, la leche de vaca es rica en β -lactoglobulina, proteína que no se encuentra en la leche de mujer y que es una de las principales responsables de la alergia a proteínas de leche de vaca junto con la caseína (García-Ara y col. 2004), y no contiene diversas proteínas con funciones de defensa frente a las infecciones, enzimáticas, factores de crecimiento y sustancias con acción hormonal (Lönnerdal, 2014a).

La leche de vaca es más pobre que la leche de mujer en cisteína, taurina y triptófano, y más rica en tirosina y fenilalanina. Teniendo en cuenta que durante el período neonatal existe una inmadurez de los sistemas enzimáticos encargados de la síntesis de los primeros y del metabolismo de los segundos, en los niños alimentados con leche de vaca se podría producir deficiencias o sobrecargas potencialmente peligrosas (Lönnerdal, 2014a).

De lo anteriormente referido se deduce que para acercar la leche de vaca a la leche humana, dos son los principales cambios que habrá que introducir: reducir su contenido proteico y corregir el cociente caseína/proteínas del suero. Con ello conseguiremos un menor aporte y una mejor digestión de proteínas, al mismo tiempo que un suministro de aminoácidos similar al proporcionado por la leche humana.

El nitrógeno no proteico está en cantidades muy bajas en la leche de vaca respecto de la leche humana (5% vs 30%). Son muy diversas las sustancias que componen esta fracción nitrogenada de la leche pero no en todos los casos se sabe qué función desempeñan. Sí sabemos la función de algunos aminoácidos: la alanina, que es un buen sustrato neoglucogénico; la glutamina, que es utilizada por el entericito para obtener energía; la taurina, de gran importancia en la primera época de la vida; o la carnitina, que participa en la oxidación de ácidos grasos, entre otras funciones metabólicas. El patrón de nucleótidos de la leche de mujer es muy distinto al de la leche de vaca y, además, contiene una cantidad relativamente elevada de ácido orótico, nucleobase ausente en la leche humana (Gil Hernández A y col. 2010).

Hidratos de carbono

La leche humana (6-7 g/100 ml, 40% de la energía total) tiene un contenido mucho más elevado que la leche de vaca (4-5 g/100 ml, 25 % de la energía total), si bien en ambos casos el componente mayoritario es la lactosa. Así pues, habrá que enriquecer el producto en lactosa, que, además de su función energética, actúa como estímulo para la maduración de la actividad lactasa, supone la única fuente de galactosa, favorece la absorción del calcio y el establecimiento de una flora bifidógena. Además, el 10% de los hidratos de carbono de la leche humana son oligosacáridos (fucosa, glucosamina, galactosamina, inositol, factor de crecimiento de *Bifidobacterium bifidum*), prácticamente ausentes en la leche de vaca, entre cuyas funciones se encuentran promover la proliferación de bifidobacterias, inhibir la adhesión bacteriana a las superficies epiteliales, estimular el sistema inmunitario y participar en la síntesis de gangliósidos y esfingolípidos cerebrales. Debido a estas propiedades, se entiende el interés en suplementar las fórmulas infantiles con prebióticos.

Grasas

Proveen el 50 % de las calorías de la leche y las diferencias no son cuantitativamente llamativas entre la leche de vaca y la humana; sin embargo, las calidades de unas y otras son muy diferentes. En la leche de vaca dominan los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), y los de larga son de tipo saturado. Por el contrario, la leche humana escasea en los primeros, y en cuanto a los segundos es rica en los de tipo no saturado. Además, la grasa de la leche humana se absorbe mejor que la de la leche de vaca, ya que tiene menos ácido esteárico (7% frente a 13%) y más ácido palmítico esterificado en la posición sn-2 de la molécula de glicerol (75% frente a 33%).

La leche humana es más rica en LA (3-6% frente a 1,2% del contenido energético total), en ALA (0,5 % del contenido energético total), en ácido oleico (36,4 %) y AGPI-CL (AA y DHA) imprescindibles para el desarrollo de la función neural y retiniana; sin embargo, el contenido en ácido láurico y ácido mirístico es significativamente menor que en la leche de vaca. La concentración de colesterol es mayor en la leche de mujer que en la de vaca (30-40 mg frente a 10-15 mg/100 ml) sin que se conozca bien si ello tiene importancia metabólica. El patrón de gangliósidos, glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico que muestra una actividad inhibidora de las enterotoxinas, es diferente en los dos tipos de leche (Rueda y col. 1995; Pan y col. 2000).

De lo anteriormente referido se deduce que si los lípidos de la leche de vaca son considerados poco útiles, habrá que modificarlos para conseguir un patrón de ácidos grasos similar al de la leche humana. Para ello se procede a desgrasar total o parcialmente la leche de vaca, reemplazando los lípidos por aceites vegetales (oliva, girasol, canola, soja) ricos en ácidos grasos esenciales y poliinsaturados. También se han utilizado en ciertas ocasiones grasas animales (óleo de cerdo) cuyos triglicéridos tienen una estructura semejante a la de la leche humana, con el ácido palmítico en posición interna.

Minerales.

La leche de vaca presenta en conjunto un contenido mineral tres veces superior al de la leche humana, si bien el análisis individual muestra que algunos de estos minerales, como hierro, cobre, cobalto, yodo y manganeso, se encuentran en mayores cantidades en la leche humana. Este alto contenido mineral de la leche de vaca, junto con el mayor contenido proteico, representa para el lactante una mayor carga renal de solutos en una edad de la vida en la que la función renal es inmadura (Ziegler EE y col. 1989), principalmente en su capacidad de concentración, con la consiguiente amenaza de desequilibrios electrolíticos, especialmente la temida deshidratación hipertónica.

En calcio y fósforo, la leche de vaca es más rica que la leche humana; sin embargo, los niños alimentados con leche de vaca, a pesar de recibir más calcio, paradójicamente tienden a la hipocalcemia y al raquitismo. La razón de ello radica en que a nivel intestinal existe una relación inversa entre la absorción de calcio y de fósforo; por ello, la leche humana con un cociente Ca/P de 2,3 (muy superior al cociente de 1,3 de la leche de vaca), protege a los niños de la hipocalcemia ya que favorece la absorción del calcio (75 % frente a 20-30 %). Además, la pobreza en lactosa y el tipo de ácidos grasos que contiene la leche de vaca inducen la formación de jabones cálcicos (Koo y col. 2006), otro hecho que favorece la aparición de las alteraciones anteriormente referidas.

El contenido de hierro no es muy alto en ninguna de las dos leches, y su absorción es mucho mejor desde la leche de la madre (50-70 %) que desde la leche de vaca (10-30 %), ya que su biodisponibilidad es diferente; esto se debe a las altas concentraciones de calcio, fósforo y proteínas (Urdampilleta Otegui y col. 2010).

| Tabla 1-7 Contenido en minerales y vitaminas de la leche humana y la leche de vaca | | |
|---|---------------------|----------------------|
| | <i>Leche humana</i> | <i>Leche de vaca</i> |
| Minerales | | |
| Azufre (mg) | 14 | 12 |
| Calcio (mg) | 34 | 120 |
| Cinc (mg) | 0,3 | 0,3 |
| Cloro (mEq) | 1,1 | 2,9 |
| Cobalto (µg) | 1,4 | 0,08 |
| Cobre (µg) | 39 | 11 |
| Fósforo (mg) | 14 | 92 |
| Hierro (µg) | 76 | 60 |
| Magnesio (mg) | 2,8 | 12 |
| Manganeso (µg) | 4,1 | 2,5 |
| Potasio (mEq) | 1,3 | 3,5 |
| Sodio (mEq) | 0,7 | 2,2 |
| Yodo (µg) | 7 | 8 |
| Vitaminas | | |
| A (µg) | 55 | 30 |
| Ácido fólico (µg) | 5,2 | 5,5 |
| B ₁₂ (µg) | 0,05 | 0,42 |
| B ₆ (µg) | 13 | 46 |
| Biotina (µg) | 0,58 | 3,5 |
| C (mg) | 44 | 17 |
| β-caroteno (mg) | 24 | 18 |
| D (µg) | 0,1 | 0,8 |
| E (µg) | 350 | 140 |
| K (µg) | 0,2 | 3,5 |
| Niacina (µg) | 230 | 90 |
| Riboflavina (µg) | 35 | 180 |
| Tiamina (µg) | 15 | 37 |
| Los valores de los nutrientes corresponden a unidades/100 ml | | |

Tomado de Maldonado y col. 2010.

Vitaminas.

El contenido vitamínico de la leche humana es suficiente para cubrir las necesidades del lactante. Con respecto a la leche de vaca el problema se centra no sólo en su contenido, que ya de por sí es inferior en algunas vitaminas con respecto a la leche humana (A, E, C, niacina), sino en las pérdidas que de estas vitaminas se producen en el curso de la recogida de la leche, en las diferentes etapas del tratamiento industrial y en su almacenamiento (Lešková y col. 2006).

Factores funcionales

Como ya se ha comentado anteriormente, en la composición de la leche humana destacan una gran variedad de factores que tienen funciones importantes en la síntesis, proliferación y diferenciación celular así como en la maduración y en la función de órganos y tejidos, confieren a la leche humana propiedades de defensa frente a la infección y muchos de estos factores favorecen el desarrollo de una microbiota intestinal en la que predominan bifidobacterias y lactobacilos, muy diferente de la que presentan los lactantes alimentados con fórmulas basadas en la leche de vaca, en donde junto a bifidobacterias destacan bacteroides, clostridios y estreptococos.

1.2.2. Fórmulas lácteas infantiles (Maldonado y col. 2010; Martínez y col. 2014; Reglamento 2016/127).

El término fórmula láctea infantil se emplea para designar productos destinados a la alimentación artificial de los lactantes, adecuados para sustituir total o parcialmente a la leche humana, cubriendo las necesidades nutritivas de esta etapa de la vida.

La Asociación Americana de Pediatría (*American Academy of Pediatrics, AAP*) y la ESPGHAN (*European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition*), así como el panel de nutrición de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority, EFSA*), actuando este último como comité asesor de la Comisión Europea, han establecido una serie de recomendaciones, que se actualizan cada cierto tiempo, sobre cuáles han de ser las características cuantitativas y cualitativas de estas fórmulas. Existen dos tipos de fórmulas: preparado para lactantes (fórmula de inicio, leche para lactantes o leche 1) y preparado de continuación (fórmula de continuación, leche de continuación o leche 2). La razón para recomendar dos tipos diferentes de fórmulas durante el primer año de vida es que a los 6 meses el lactante alcanza la madurez en los procesos de digestión y de absorción intestinal, así como en la actividad de las enzimas del metabolismo intermediario y de la función excretora renal, semejante o próxima a la del adulto (Maldonado y col. 2010). Por este motivo, ya no se considera necesario a estas edades la administración de una fórmula tan complicada y costosa como la inicial.

En el año 2014 la EFSA publicó las últimas recomendaciones sobre la composición de las fórmulas de inicio y de continuación, lo que ha dado lugar a un nuevo Reglamento (Reglamento 2016/127) sobre los requisitos técnico-sanitarios para los preparados de lactantes y los preparados de

continuación. Este Reglamento está ya en vigor, aunque se contempla un periodo de transición hasta febrero de 2020 para la adaptación al mismo en todos los países de la Unión Europea.

Las llamadas fórmulas de crecimiento (junior, leche de crecimiento o leche 3), de gran difusión en los últimos años, no están reguladas legalmente aunque su composición se ajusta a las recomendaciones para las fórmulas de continuación así como a los conocimientos sobre nuevos factores nutricionales (Dalmau Serra y col. 2011; European Commission, 2016).

Preparados para lactantes.

Los preparados para lactantes se caracterizan porque cubren por sí solos todos los requerimientos nutricionales del lactante sano hasta los 6 meses de vida. Pueden ser utilizados hasta la edad de 12 meses, siempre y cuando se administre junto con otros alimentos (alimentación complementaria). Se basa en la leche de vaca, sobre la que se realiza una serie de modificaciones para adecuarla a las necesidades nutricionales del lactante (tabla 1-8).

El *contenido energético* debe ser parecido al de la leche humana (60-70 kcal/100 ml). Las *proteínas* (1,8-2,5 g/100 kcal) deben tener un valor biológico tal que contengan al menos la misma cantidad de aminoácidos esenciales y condicionalmente esenciales de la proteína de referencia (leche humana). Es necesario establecer un máximo en el contenido proteico, especialmente en los 3 primeros meses de vida, pues un aporte proteico excesivo supone una sobrecarga de solutos y de radicales ácidos para un riñón con limitada capacidad de concentración y de acidificación y una sobrecarga excesiva de aminoácidos para la capacidad de algunos sistemas enzimáticos, lo que podría favorecer la aparición de hiperaminoacidemias que pueden tener efectos deletéreos, especialmente sobre el sistema nervioso central. De hecho, este nuevo reglamento (Reglamento 2016/127) sobre la composición de los preparados para lactantes ha bajado el límite mínimo de proteína de 3,0 g/100 kcal a 2,5 g/100 kcal. Respecto al origen de las proteínas, desde el año 2013 (Directiva 2013/46) está permitido el uso tanto de proteínas de la leche de vaca como de proteínas de la leche de cabra. Actualmente se están utilizando en la fabricación de las fórmulas infantiles concentrados de proteínas ricos en α -lactoalbúmina, debido a su alto contenido en aminoácidos esenciales que permite reducir el contenido total de proteínas en las fórmulas sin perjudicar el aporte de dichos aminoácidos.

Otra novedad del reglamento es que la L-carnitina pasa a ser de adición obligatoria, en una cantidad mínima de 1,2 g/100 kcal. La *carnitina* es necesaria para la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, del metabolismo de compuestos acetyl-CoA, de la cetogénesis y del balance nitrogenado. En cuanto a la *taurina* (máximo 12 mg/100 kcal), esencial para el desarrollo del sistema nervioso central y para la conjugación de las sales biliares, puede ser necesaria la suplementación en los neonatos de bajo peso, no así en los nacidos a término en los que no existen evidencias concluyentes.

Los *nucleótidos* constituyen el 20% del nitrógeno no proteico de la leche humana y, como se ha indicado anteriormente, diversos estudios han sugerido que deban ser considerados como nutrientes semiesenciales para el neonato. Está plenamente asumido que la adición de nucleótidos a los preparados para lactantes en calidad y cantidad semejante a la leche humana, tiene efectos beneficiosos sobre la salud del lactante (Maldonado Lozano, 2014b): metabolismo de las lipoproteínas, del colesterol y de los AGPI; proliferación y diferenciación de los enterocitos; modificación de la microbiota intestinal; y estimulación y modulación del sistema inmunitario. Además, las fórmulas infantiles con nucleótidos han demostrado potenciar la respuesta del recién nacido frente a las vacunas de la difteria, *H.influenzae* tipo b y poliovirus (Pickering y col. 1998; Schaller y col. 2004).

En los últimos años, se ha señalado que el consumo de una fórmula láctea suplementada con nucleótidos induce un mayor valor de la proporción *Bifidobacterium/Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella*, que no difiere del que presenta los alimentados al pecho (Shingal y col. 2008), y que estimula en los lactantes una mayor ganancia de peso y de perímetro craneal (Shingal A y col. 2010). Teniendo en cuenta todos estos datos, junto con los aportados por los metaanálisis (Gutiérrez-Castrellón y col. 2007) y las revisiones bibliográficas (Schaller y col. 2007; Cilla y col. 2012), se puede establecer la hipótesis de que la suplementación con nucleótidos de los preparados para lactantes puede tener importantes implicaciones para optimizar la dieta de los lactantes en los primeros meses de la vida. De hecho, la legislación (RD 867/2008) establece para los preparados para lactantes un contenido máximo de nucleótidos de 3,3 mg/100 ml (5 mg/100 kcal).

Tabla 1-8. Normativa sobre el contenido en energía y nutrientes de los preparados para lactantes y los prepatados de continuación.

| | <i>Inicio (0-6 meses)</i> | <i>Continuación (> 6 meses)</i> |
|------------------------------|-------------------------------|--|
| Energía (kcal/dl) | 60-70 | 60-80 |
| Proteínas | 1,8-2,5 | 1,8-2,5 |
| Grasas (g) | 4,4-6 | 4,4-6 |
| Ácido linoleico (g) | 0,3-1,2 | 0,3-1,2 |
| Ácido α -linolénico | 0,05-0,1 | 0,05-0,1 |
| Ácido docosahexaenoico | 0,02-0,05 | 0,02-0,05 |
| Glúcidos (g) | 9-14 | 9-14 |
| Minerales | | |
| Calcio (mg) | 550-140 | 50-140 |
| Cinc (mg) | 0,5-1 | 0,5-1 |
| Cloruro (mg) | 5060-160 | 5060-160 |
| Cobre (μ g) | 35-8060-100 | 3560-100 |
| Fósforo (mg) | 25-90 | 25-90 |
| Hierro (mg) | 0,3-1,3 | 0,6-2 |
| Magnesio (mg) | 5-15 | 5-15 |
| Potasio (mg) | 6080-160 | 6080-160 |
| Sodio (mg) | 2025-60 | 2025-60 |
| Yodo (μ g) | 10-5015-29 | 10-5015-29 |
| Vitaminas | | |
| A (μ g ER) | 200-60070-114 | 200-60070-114 |
| Ácido fólico (μ g) | 10-5015-47,6 | 10-5015-47,6 |
| Ácido pantoténico (μ g) | 400-2.000 | 400-2.000 |
| B ₁₂ (μ g) | 0,1-0,5 | 0,1-0,5 |
| B ₆ (μ g) | 3520-175 | 3520-175 |
| Biotina (μ g) | 1,51-7,5 | 1,51-7,5 |
| C (mg) | 84-30 | 104-30 |
| D (μ g) | 40-1002-3 | 40-1202-3 |
| E (mg α -ET) | 0,6-5 | 0,6-5 |
| K (μ g) | 41-25 | 41-25 |
| Niacina (μ g) | 80400-1.500 | 80400-1.500 |
| Riboflavina (μ g) | 8060-400 | 8060-400 |
| Tiamina (μ g) | 6040-300 | 6040-300 |

Los valores de los nutrientes corresponden a unidades/100 kcal. ER: equivalentes de retinol. ET: equivalentes de tocoferol.

Los valores están basados en el nuevo Reglamento 2016/127 de la Unión Europea sobre la composición de los preparados para lactantes y los preparados de continuación.

En el futuro debe establecerse el papel de la suplementación con glicina, arginina, ornitina y glutamina. La *glicina* participa en la síntesis de creatina, porfirinas, glutatión, nucleótidos, ácidos biliares y colágeno. La *arginina* mejora la retención nitrogenada tras el estrés, aumenta la síntesis de colágeno y estimula el sistema inmunitario. La *glutamina* actúa como sustrato energético en tejidos de rápida diferenciación celular, como el intestino. Además es destacable el papel bifidógeno de la *N-acetilglucosamina* y del ácido *N-acetilneuramínico*, que intervienen además en la síntesis de gangliósidos. Existen otras sustancias cuya adición a los preparados para lactantes está contemplada en la legislación, como la *colina*, precursor en la síntesis de fosfolípidos, cuyo contenido debe estar entre 25 mg y 50 mg por 100 kcal en las leches de inicio. También se contempla la adición de *inositol* que –según parece- participa en el desarrollo del intestino y que se encuentran en la leche humana. La cantidad de inositol en las leches de inicio debe estar entre 4 y 40 mg/100 kcal en los ppreparados para lactantes.

La composición de las *grasas* (4,4-6 g/100 kcal) debe ser tal que se consiga una absorción del 85%. Es admisible una mezcla de grasa animal y vegetal para intentar conseguir un acidograma parecido al de la leche humana. Se debe reducir el aporte de grasa saturada que es de más difícil absorción y puede interferir con la absorción del calcio, y se debe aumentar el nivel de ácidos grasos monoinsaturados, hasta lograr concentraciones similares a la leche humana; así, el ácido oleico debería representar el 40 % de los ácidos grasos totales. Además las nuevas recomendaciones instan a los fabricantes a limitar el contenido de ácidos grasos *trans* a un máximo del 3% del total de la grasa y el de ácido erúxico a un total del 1% de la grasa.

El contenido de ácido linoleico debe estar entre 500 y 1200 mg/100 kcal, mientras que el del ácido α -linolénico debe estar entre 50 y 100 mg/100 kcal. El cociente ácido linoleico/ácido α -linolénico debe estar entre 5 y 15, al igual que en la leche humana, aunque actualmente se considera que una proporción linoleico/ α -linolénico inferior a 10 es deseable para favorecer la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3. Una de las principales novedades de las nuevas recomendaciones es que el DHA es de adición obligatoria y su contenido debe situarse entre 20 y 50 mg/100 kcal. Esta recomendación se produce como consecuencia de la evidencia científica existente a favor del efecto del DHA sobre el desarrollo visual y cognitivo de los niños. Aunque el organismo tiene la maquinaria enzimática necesaria para su síntesis a partir del ácido α -linolénico, las necesidades durante las primeras etapas de la vida son muy altas, lo que hace recomendable añadirlo a los preparados para lactantes. Si se añaden ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-6, éstos deben constituir como máximo el 2%

del total de ácidos grasos y el 1% en el caso del ácido araquidónico. El ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) no deberá superar el contenido de DHA, ya que el EPA no está presente en la leche materna o lo está en cantidades muy bajas. La adición de estos ácidos grasos parece aconsejable, ya que son precursores indispensables para la síntesis de eicosanoides y como componentes estructurales importantes de los sistemas de membranas, siendo especialmente ricos en ellos los fosfolípidos del sistema nervioso central y de las células fotorreceptoras de la retina.

Al analizar los estudios realizados sobre el efecto de la suplementación de los preparados para lactantes con AGPI-CL sobre el desarrollo, se han encontrado resultados contradictorios (Uauy y col. 2009, Qavasmí y col. 2013). En algunos estudios se había encontrado un efecto positivo sobre la agudeza visual en los lactantes que tomaban fórmulas suplementadas con AGPI-CL y se sugería que era necesaria dicha suplementación durante los primeros 12 meses de la vida, pero este efecto sobre la visión no se confirmó a largo plazo. Una revisión Cochrane de 15 estudios no encontró ningún efecto sobre la agudeza visual (Simmer y col. 2011).

Últimamente se está dando una gran importancia a la influencia del aporte graso sobre el desarrollo de la arteriosclerosis. Aunque la etiología de esta enfermedad parece ser multifactorial, está demostrado que la dieta posee un papel fundamental, especialmente en el inicio del cuadro. Parece ser que la dieta administrada al lactante puede afectar la homeostasis del colesterol en edades posteriores, influyendo no sólo los aportes de colesterol sino también sobre la relación poliinsaturados/saturados (Owen y col. 2002). La mejor forma de conseguir una colesterolemia más similar a la de los niños que toman leche humana es administrar una fórmula con un índice poliinsaturados/saturados equilibrado (1,6-1,7) y moderado contenido de colesterol. El ácido oleico es efectivo reduciendo el colesterol unido a lipoproteínas de baja intensidad (LDL-C) en los seres humanos y, sobre todo, aumentando el colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), especialmente cuando sustituye a ácidos grasos saturados. Los ácidos grasos poliinsaturados poseen efectos menos claros; si bien es conocido que disminuyen los niveles plasmáticos de triglicéridos, recientemente se ha descrito que pueden reducir también los niveles de colesterol unido a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-C).

Como *hidratos de carbono* (9-14 g/100 kcal), las fórmulas de inicio deben contener lactosa (mínimo 4,5 g/100 kcal), aunque se admiten pequeñas cantidades de glucosa y de dextrinomaltoza. No

debe estar presente el almidón ni tampoco sustancias espesantes, salvo que las fórmulas estén destinadas a usos médicos especiales, como se menciona más adelante y, asimismo, no se debe adicionar sacarosa o fructosa.

Respecto de los *minerales*, sodio, cloro y potasio no deben sobrepasar una concentración que pueda ocasionar una sobrecarga renal de solutos y que conduzca a un desequilibrio hidroelectrolítico. Además, la concentración de sodio puede influir sobre el desarrollo de hipertensión en etapas posteriores de la vida. La ESPGHAN aconseja una concentración de sodio de 28-60 mg/100 kcal. El calcio y el fósforo deben tener un valor mínimo en la fórmula de 50 mg/100 kcal y 25 mg/100 kcal, respectivamente, con una relación calcio fósforo que esté entre 1 y 2 para facilitar la absorción de dichos minerales. El hierro no debe estar en un nivel inferior a 0,3 mg/100 kcal, siendo aconsejable una concentración de 1 mg/100 kcal. Asimismo, se aconseja un aporte de cinc de 0,5-0,9 mg/100 kcal, un aporte de cobre y manganeso semejante al de la leche humana, y un aporte de selenio de 8,6 µg/100 kcal. Con respecto a los restantes oligoelementos, no se dispone de datos suficientes para hacer una recomendación, aunque para los valores de magnesio, yodo, molibdeno y flúor también se establecen límites mínimos y máximos.

En lo relacionado con las *vitaminas*, los distintos comités de nutrición hacen propias las recomendaciones del Codex Alimentarius y se establecen valores mínimos y máximos para cada una de ellas.

Diversas sustancias presentes en la leche humana tienen efecto prebiótico. Los oligosacáridos sirven como sustrato para el crecimiento de las bifidobacterias. El ácido siálico forma parte de los oligosacáridos y está presente como diferentes componentes sialoconjugados (sialilactosa, glicoproteínas, gangliósidos y otros). Se ha demostrado que la adición de gangliósidos a los preparados para lactantes favorece el crecimiento de las bifidobacterias e interfiere sobre el crecimiento de *E. coli* (Rueda y col. 1998), y que son capaces de inhibir la acción de las enterotoxinas de algunas bacterias y la adhesión de *E. coli*. Las gluco proteínas que contienen ácido siálico pueden unirse a los rotavirus e impedir la replicación vírica (Martínez y col. 2013). La adición de nucleótidos a los preparados para lactantes promueve un perfil bacteriano en las heces próximo al de los alimentados con leche humana (Shingal y col. 2008).

La adición de oligosacáridos está también regulada, pudiendo añadirse un total de 0,8 g/100 ml de una mezcla de galacto-oligosacáridos (GOS) y fructo-oligosacáridos (FOS) en una proporción 9:1, con el objetivo de conseguir un peso molecular semejante al de los oligosacáridos de la leche humana. Sin embargo, en la actualidad no existen datos suficientes que sugieran que la suplementación de las fórmulas con prebióticos esté asociada a un efecto beneficioso frente a las infecciones, trastornos digestivos (cólico, regurgitaciones, vómitos) o para la prevención de alergia (Thomas y col. 2010; ESPGHAN, 2011; Maldonado Lozano, 2014a).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la leche humana contiene también bacterias con potencial *probiótico*. Una importante parte de las fórmulas existentes hoy día en el mercado contienen probióticos, aunque su utilización no está recogida en la legislación. Los diferentes comités de expertos apoyan su uso siempre y cuando se haya demostrado su seguridad y un beneficio para la salud y el desarrollo del niño (ESPGHAN, 2011; Maldonado Lozano, 2014a; Bertelsen y col. 2016).

Preparados de continuación

Los preparados de continuación (tabla 1-8) están diseñadas para su empleo a partir de los 6 meses de edad y siempre formando parte de un régimen mixto de alimentación; pueden utilizarse hasta los 3 años de edad, aunque generalmente se utilizan hasta los 18-20 meses. Se basan en que la capacidad funcional del aparato digestivo, la actividad de las enzimas del metabolismo intermediario y la función excretora renal han alcanzado un nivel de maduración semejante al del niño mayor. Por tanto, es posible prescindir a partir de esta época de las fórmulas de inicio más complejas y costosas, aunque en la práctica las diferencias entre la composición de los preparados para lactantes y los preparados de continuación son pocas.

El límite que se define para el *contenido energético* es el mismo que para los preparados para lactantes (60-70 kcal/100 ml), aunque después de los 6 meses los lactantes suelen ingerir alimentos adicionales.

Con respecto a la *composición proteica* (1,8-3,5 g/100 kcal) no es necesario modificar la relación caseína/proteínas del suero de la leche de vaca (80/20). Actualmente se piensa que es aceptable un contenido proteico de 1,3-1,7 g/100 ml para una dieta diversificada.

Como *hidratos de carbono* (9-14 g/100 kcal) preferentemente contendrán lactosa, aunque está permitido adicionar otros glúcidos como sacarosa, miel o fructosa (20% máximo, para que la lactosa favorezca la biodisponibilidad del calcio).

Con respecto a las *grasas* (4,4-6 g/100 kcal), no existe razón para sustituir totalmente la grasa láctea por grasa vegetal. Sin embargo, la recomendación es añadir ácido linoleico, ácido α -linolénico y DHA en cantidades similares a las comentadas anteriormente para los preparados para lactantes.

Dado que el contenido en *calcio* de la alimentación complementaria suele ser bajo, deben aportarse aproximadamente 400 mg/día (500 ml) con la fórmula, siendo la relación Ca/P entre 1 y 2. La suplementación con *hierro* es obligada (10,6 mg/100 kcal) y se debe hacer con sales ferrosas, cuya buena tolerancia es conocida; por otra parte, para favorecer la absorción del hierro las fórmulas deberán contener ácido ascórbico y la relación hierro/cinc no debe ser superior a 2,5. Los requerimientos de hierro aumentan en esta etapa y por ello el límite mínimo de hierro es mayor en las fórmulas de continuación que en las de inicio. En relación con el *flúor*, se puede iniciar la suplementación a partir de los 6 meses de edad solamente cuando el contenido del agua sea inferior a 0,3 mg/l, ya que influye en el contenido de la fórmula.

Diversos estudios muestran que la adición de *prebióticos* y de *probióticos* (Thomas y col. 2010; ESPGHAN, 2011; Maldonado Lozano, 2014a; Bertelsen y col. 2016) aumenta la colonización por estas bacterias en el intestino del lactante de forma semejante a los alimentados al pecho. En el mercado existen fórmulas con prebióticos, probióticos y con ambos (*simbióticos*), aunque existen pocos datos sobre su utilidad (ESPGHAN, 2011; Mugambi y col. 2012). La EFSA hace referencia a la adición de bacterias a dichas fórmulas. En este documento afirma que si bien no hay duda sobre la seguridad de las bacterias probióticas que han sido utilizadas en nutrición infantil, considera que se deben de realizar más estudios que con un grado de evidencia máximo demuestren su eficacia (EFSA, 2014).

2. ORIGEN DE LA MICROBIOTA.

2.1 Adquisición de la microbiota intestinal humana

Los procesos por los cuales se produce el establecimiento de las poblaciones microbianas dentro del tracto gastrointestinal son muy complejos y variados, dando lugar a distintas poblaciones a lo largo del tubo digestivo. Durante los primeros días de vida en la microbiota predominan las bacterias facultativas como *Escherichia coli* y otras enterobacterias, enterococos, y estafilococos, las cuales, al no existir competición alguna con otros microorganismos anaerobios, suelen alcanzar altos niveles en la microbiota. Conforme aumenta el número de bacterias aerobias y facultativas, éstas van consumiendo el oxígeno y se crean las condiciones idóneas para que las bacterias anaerobias sean las que colonicen, como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, y *Veillonella* (Adlerberth y col. 2000).

La colonización intestinal del neonato está influida por diversos factores, tales como la gestación, el tipo de parto y el tipo de lactancia (López Moriana y col. 2014). El paso a través del canal del parto y la consiguiente exposición a la microbiota de la madre (vaginal y/o fecal), durante tiempo se ha considerado que representa el suceso iniciador para la colonización microbiana del tracto gastrointestinal del recién nacido. Sin embargo, en un estudio epidemiológico se observó que sólo una cuarta parte de los niños adquirieron lactobacilos vaginales al nacer y que al mes, éstos ya competían con los lactobacilos asociados a la leche humana (Matsumiya y col. 2002). Posteriormente se constató que los lactobacilos encontrados en las heces de los recién nacidos no eran similares a los de la vagina materna (Martin y col. 2007), por lo que se puede sugerir que los lactobacilos vaginales se transfieren, pero no colonizan con éxito el intestino neonatal. A pesar de que solo algunas bacterias presentes en el canal del parto colonizarán de forma permanente al lactante, la exposición inicial es fundamental para el desarrollo apropiado del ecosistema de la microbiota adulta (Domínguez-Bello y col. 2010).

En el caso de los partos por cesárea, la microbiota presente en el recién nacido provendría con mayor probabilidad del medio ambiente que le rodea. Domínguez-Bello y col (2010) han descrito que los nacidos por parto natural tienden a presentar niveles más elevados de *Lactobacillus* spp. en las heces, la piel, la boca y la nasofaringe, en concordancia con la microbiota vaginal dominante de las madres, mientras que en los casos de cesárea, las comunidades bacterianas representadas en el intestino y los otros tejidos estudiados eran más parecidas a las encontradas en la superficie de la piel de los progenitores, dominadas por *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* spp. Los estudios

sobre la microbiota fecal de los niños nacidos por cesárea o por parto natural, sugieren que la microbiota de los neonatos nacidos por cesárea presenta una diversidad bacteriana superior comparada con la de los nacidos por parto natural (Biasucci y col. 2008; Pandey y col. 2012).

Sin embargo, no se ha podido demostrar fehacientemente que la microbiota del niño esté íntimamente ligada con el tipo de parto (Matsumiya y col. 2002; Ahrné y col. 2005; Martín y col. 2007; López Moriana y col. 2014) y sí se ha llegado a demostrar una transferencia de tipo vertical de bacterias por parte de la madre al recién nacido a través de la leche (Martín y col. 2007; Pérez y col. 2007; Milani y col. 2015). Probablemente no sea casual que las bacterias anaerobias facultativas que colonizan el tracto gastrointestinal del neonato sean los grupos bacterianos más representativos de la microbiota de la leche humana.

En la última década, diversos estudios han demostrado que los primeros contactos del niño con bacterias comensales se producirían aún antes del parto, en su etapa fetal, puesto que se han detectado bacterias de este tipo en el cordón umbilical y en el meconio de recién nacidos (Jiménez y col. 2005; Jiménez y col; 2008) (figura 2-1), incluso se pueden aislar esas bacterias en el calostro antes del nacimiento. Además, se puede argumentar que la presencia de bacterias en la leche humana no se debe simplemente por una contaminación, ya que las bifidobacterias son anaerobias estrictas y es poco probable que se transporten desde la boca a la piel de la mama, y no podemos obviar que las bacterias vivas administradas oralmente a las mujeres lactantes, se pueden recuperar de la leche (Jiménez y col. 2008; Arroyo y col. 2010).

Las especies bacterianas aisladas de sangre de cordón umbilical y de meconio (*E. faecium*, *P. acnes*, *S. epidermidis*, *St. sanguinis* y *E. coli*) se encuentran entre las que suelen estar asociadas con la microbiota oral y gastrointestinal de la madre. Estas bacterias podrían diseminarse desde el tracto digestivo hacia lugares extradigestivos gracias a las células dendríticas, que pueden penetrar el epitelio y tomar bacterias directamente del lumen intestinal (Rescigno y col. 2001). Una vez en el interior o pegadas a las células dendríticas, o a los macrófagos, las bacterias podrían llegar a otras mucosas a través del torrente sanguíneo empleando la circulación de las células del sistema inmunitario (Martín y col. 2004).

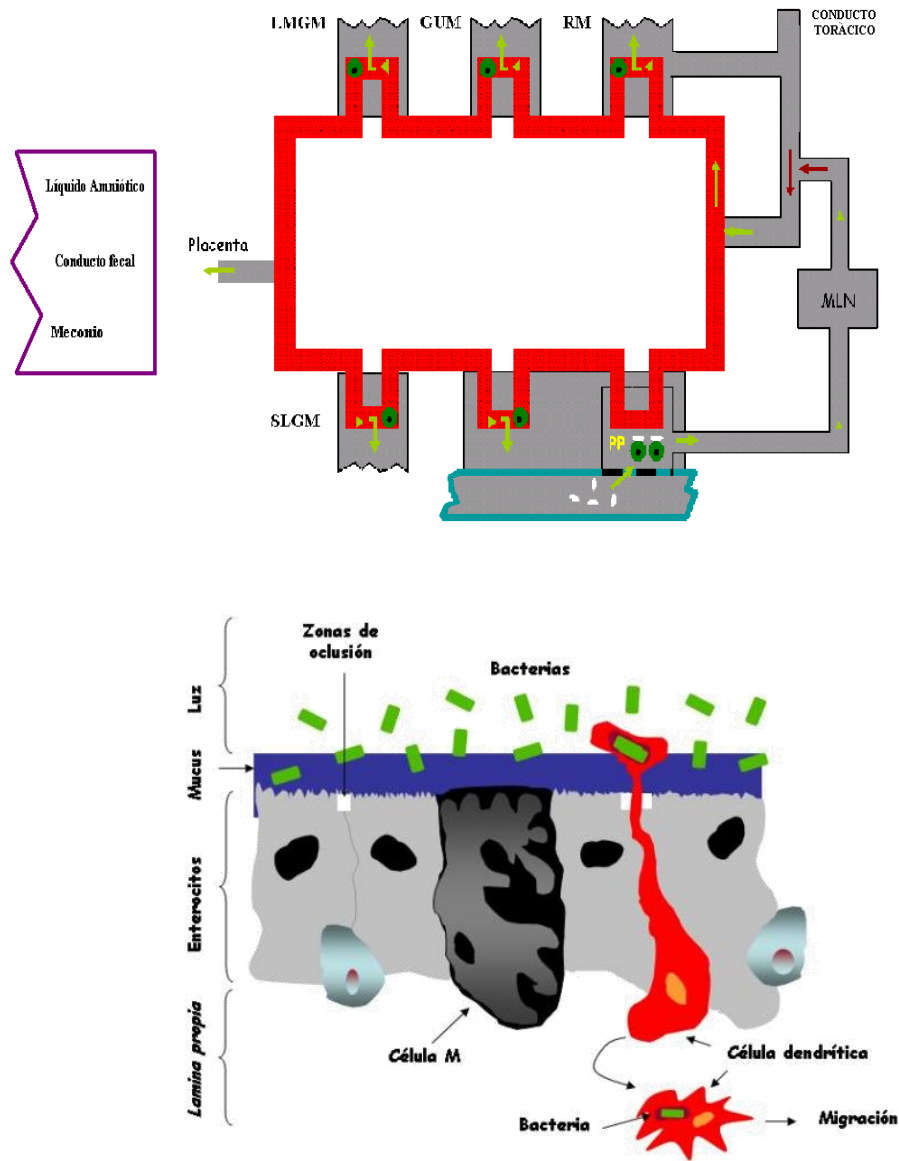


Figura 2-1. Modelo hipotético de transferencia de bacterias desde la madre al feto y al tracto gastrointestinal del recién nacido. (Basado en el modelo expuesto por Martín y col. 2004). GUM: tracto genitourinario; LMGM: mucosa de la glándula mamaria; MLN: nódulo linfático mesentérico; PP: placas de Peyer; RM: mucosa del tracto respiratorio; SLGM: mucosa de las glándulas salivares y lacrimales.

Estudios en animales han demostrado la existencia de grupos bacterianos en el líquido amniótico de ratonas gestantes y en el intestino de sus correspondientes fetos (Bearfield y col. 2002; Martin y col. 2004; Budunelli y col. 2005; Jiménez y col. 2005), y han confirmado que un cambio en la microbiota intestinal materna tiene un marcado efecto en la colonización y desarrollo intestinal de su prole (Fåk y col. 2008).

También en mujeres gestantes sanas se han detectado bacterias en líquido amniótico. La administración oral de un probiótico durante el embarazo no sólo causa la colonización del tracto gastrointestinal materno, sino también la de sus hijos sin necesidad de que éstos ingieran directamente el probiótico (Schultz y col. 2004; Jiménez y col. 2005).

El aislamiento de enterococos y estafilococos en sangre de cordón umbilical en mujeres y niños sanos, así como la detección de DNA de bifidobacterias y lactobacilos en placenta humana, confirma que el paso a través de la placenta es una de las rutas que utilizan las bacterias comensales hacia la cavidad amniótica (Jiménez y col. 2005; Satokari y col. 2009; Nuriel-Ohayon y col. 2016). De hecho, muchas de estas especies bacterianas también se aíslan del meconio de neonatos sanos, a pesar de que tradicionalmente se ha considerado que este material biológico era estéril (Jiménez y col. 2008a; Hansen y col. 2015; Nuriel-Ohayon y col. 2016). Recientemente se ha comunicado que la placenta presenta mayor diversidad bacteriana que la vagina, y que la diversidad bacteriana en las heces de los recién nacidos también es mayor que la de la vagina materna y más parecida a la placentaria (Dong y col. 2015).

Estos hallazgos ponen de manifiesto que la cavidad amniótica debe considerarse un nicho ecológico que alberga una diversidad de microorganismos mucho mayor de la que se suponía (DiGulio y col. 2008). Parte de esta microbiota podría estar protegida frente a elementos adversos, como leucocitos o péptidos antimicrobianos, mediante la formación de *biofilms* en los que las células se mantienen en agregados mediante la producción de polímeros extracelulares (Steele y col. 2005). Esto explicaría el hecho de que estas bacterias no induzcan una respuesta inflamatoria y la dificultad de obtener cultivos positivos con las muestras de líquido amniótico (Romero y col. 2007).

Tras el nacimiento, aunque el estrecho contacto del niño con la madre favorece la transferencia de bacterias de la cavidad oral y piel de la madre al hijo (Mackie y col. 1999), es la leche de la madre la

que representa un papel fundamental en el establecimiento de la microbiota del niño. Así, la leche no solo aporta componentes bifidogénicos, como los oligosacáridos que favorecen la instauración de determinados grupos bacterianos, sino que también aporta directamente bacterias comensales procedentes del propio intestino de la madre (Martín y col. 2003; Nuriel-Ohayon y col. 2016). Hoy día se reconoce la gran influencia de este fluido biológico en la colonización del intestino del neonato, cuya importancia parece ser muy superior a la del tránsito por el canal del parto (Martín y col. 2007).

En un estudio reciente, realizado en 15 parejas madre-hijo, se investigó la transferencia microbiana prenatal y postnatal y la colonización intestinal a partir del análisis de la microbiota en las heces de la madre, la placenta, el líquido amniótico, el calostro y el meconio (Collado y col. 2016). Los datos obtenidos mediante cultivo bacteriano convencional, pirosecuenciación del gen 16S rRNA, PCR cuantitativa y electroforesis en gel desnaturalizante, revelaron que la placenta y el líquido amniótico presentaban una microbiota con características compartidas con la microbiota del meconio, lo que sugiere que existe una transferencia microbiana en la interfase feto-materna. A la edad de 3-4 días, la composición de la microbiota intestinal del recién nacido empezaba a parecerse a la detectada en el calostro de la leche materna. Basados en estos datos, los autores proponen que el proceso de colonización microbiana del intestino se iniciaría prenatalmente a partir de la microbiota de la placenta y del líquido amniótico, y se continuaría después del nacimiento por las bacterias presentes en la leche materna.

2.2. Microbiota de la leche humana

Desde hace tiempo se sabe que la microbiota intestinal de los niños amamantados es diferente de la de los niños alimentados con fórmula (Balmer y col. 1989). Lactobacilos y bifidobacterias predominan en los primeros, mientras que enterobacterias, como *E.coli*, *Bacteroides* y *Staphylococcus* dominan la microbiota de los segundos. Determinados componentes de la leche humana, como oligosacáridos y algunas proteínas del lactosuero son responsables del establecimiento de esta microbiota, ya que favorecen el crecimiento de bacterias saludables al provocar un descenso del pH intestinal, poco favorable para el crecimiento de bacterias patógenas.

Hasta hace poco tiempo la leche humana se consideraba un fluido biológico estéril, ya que no había evidencias de que contuviera bacterias. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado la presencia de bacterias en la leche humana. Determinadas bacterias ácido-lácticas forman parte de la

composición de la leche humana y puede ser una importante fuente de bacterias ácido-lácticas para el bebé, lo cual contribuiría al establecimiento de la microbiota intestinal favorable que se observa en niños amamantados (Martín y col. 2003; Martín y col. 2004). Estas bacterias no son simplemente el resultado de la contaminación de la piel circundante, sino que es probable que tengan un origen endógeno (Rodríguez, 2014).

Los datos disponibles hasta la fecha indican que entre las bacterias que se aíslan de la leche humana, destacan diversas especies de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Weisella*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Ralstonia*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Blautia*, *Bacteroides*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas*, *Veillonellas*, *Leptotrichia*, *Prevotella* y *Bradyrhizobium* (Martín y col. 2003; Heikkila y col. 2003; Gueimonde y col. 2007; Collado y col. 2009; Cabrera-Rubio y col. 2012; Jost y col. 2013; González y col. 2013; Khodayar-Pardo y col. 2014; McGuire y col. 2015) (tabla 2-1). Ward y col (2013), que utilizaron la tecnología de secuenciación para caracterizar todo el material genético (Metagenoma), identificaron más de 360 géneros procariotas y los filos *Proteobacterias* y *Firmicutes* eran los dominantes. Las diferencias entre los hallazgos referidos con anterioridad y los de este estudio, probablemente estén relacionadas con diversas variables, tales como métodos de recolección, técnicas de extracción, plataformas de secuenciación y factores ambientales.

Así pues, existen pruebas irrefutables de que la leche humana contiene una comunidad bacteriana diversa y viable, incluso cuando es producida por mujeres sanas sin signos o síntomas de mastitis u otra enfermedad mamaria. El reconocimiento de que en la leche humana existe una comunidad bacteriana importante, plantea la idea de si la leche humana deber ser considerada como un alimento probiótico (McGuire y col. 2016).

La concentración de bacterias en la leche humana oscila entre 10^2 y 10^4 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, por lo que garantiza un aporte continuo de bacterias durante todo el periodo de lactancia. Se estima que un lactante que ingiera aproximadamente 800 ml de leche al día recibe entre 10^5 y 10^7 UFC (Heikkilä y col. 2003; Rodríguez y col. 2008). Por lo tanto, la leche humana es una de las principales fuentes de bacterias comensales para el recién nacido y desempeña un papel clave en la colonización inicial de su intestino. Diversos estudios evidencian el papel fundamental que juega la lactancia materna en la colonización del intestino del niño, mostrando diferencias significativas entre la

microbiota de los niños amamantados y los alimentados con lactancia artificial. Así, en los niños alimentados con leche humana se suele observar una menor presencia de enterobacterias, estreptococos, bacteroides y clostridios, en beneficio de una mayor cantidad de bifidobacterias, al revés de lo que sucede en los alimentados con preparados para lactantes (Balmer y col. 1989; Favier y col. 2002, Harmsen y col. 2000a). Se ha descrito una mayor concentración de bacterias del grupo *Coriobacterium* (*Coriobacterium* y *Collinsella*) en heces de niños alimentados con preparados lácteos (Harmsen y col. 2000b).

Tabla 2-1. Bacterias aisladas de la leche humana

| Lactobacillus | Otras bacterias Lácticas | Bifidobacterium | Staphylococcus | Streptococcus | Otras bacterias Gram + | Bacterias Gram - |
|----------------------|----------------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| <i>L. fermentum</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>B. breve</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. bovis</i> | <i>Actinomyces odontolyticus</i> | <i>Acinetobacter johnsonii</i> |
| <i>L. gasseri</i> | <i>Enterococcus faecium</i> | <i>B. bifidum</i> | <i>S. epidermitis</i> | <i>S. mitis</i> | <i>Arthrobacter cumminsii</i> | <i>Bacteroides sp.</i> |
| <i>L. gastricus</i> | <i>Lactococcus lactis</i> | <i>B. longum</i> | <i>S. hominis</i> | <i>S. oralis</i> | <i>Bacillus vietnamiensis</i> | <i>Burkholderia multivorans</i> |
| <i>L. plantarum</i> | <i>Leuconostoc citreum</i> | <i>B. adolescentis</i> | <i>S. xylosus</i> | <i>S. parasanguis</i> | <i>B. pumilus</i> | <i>Citrobacter freundii</i> |
| <i>L. reuteri</i> | <i>Leuconostoc fallax</i> | <i>B. dentium</i> | <i>S. haemolytica</i> | <i>S. salivarius</i> | <i>Corynebacterium aurimucosum</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>L. rhamnosus</i> | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | <i>B. catenulatum</i> | <i>S. lugdunensis</i> | <i>S. infantis</i> | <i>C. coylae</i> | <i>Klebsiella milletis</i> |
| <i>L. salivarius</i> | <i>Pediococcus pentosaceus</i> | | | <i>S. peroris</i> | <i>C. pseudogenitalium</i> | <i>K. oxytoca</i> |
| <i>L. vaginalis</i> | <i>Weisella cibaria</i> | | | | <i>Gemella haemolysans</i> | <i>K. Pneumoniae</i> |
| | <i>Weisella confusa</i> | | | | <i>Kocuria kristinae</i> | <i>Kluyvera cryocrescens</i> |
| | | | | | <i>K. rhizophila</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | | | | | <i>Micrococcus luteus</i> | <i>P.pseudoalcaligenes</i> |
| | | | | | <i>Paenibacillus amyolyticus</i> | <i>P. synxanthia</i> |
| | | | | | <i>Propionibacterium acnés</i> | <i>Serratia proteamaculans</i> |
| | | | | | <i>P. granulorum</i> | |
| | | | | | <i>Rothia mucilaginoso</i> | |

Modificado de Rodríguez y col. 2008.

Así pues, no es de extrañar que la microbiota intestinal del recién nacido refleje la existente en la leche humana. El bajo número de especies bacterianas encontradas en la leche concuerda con el reducido espectro bacteriano del que se compone la microbiota intestinal de los lactantes y que va seguido de un aumento de la variedad de la microbiota con el final de la lactancia y el inicio del destete. Al inicio de la fase de destete, se van introduciendo progresivamente alimentos sólidos y paralelamente se va reduciendo la ingesta de leche materna hasta su completa sustitución. Estas circunstancias producen grandes cambios en la composición de la microbiota intestinal infantil, de tal manera que, en poco tiempo, desaparecen las diferencias entre la microbiota de los lactantes amamantados y la de los alimentados con fórmulas lácteas (Stark y col. 1982; Mackie y col. 1999). En general, se estima que los grupos microbianos dominantes en la microbiota intestinal de los niños de 2 años son similares a los de los adultos, aunque todavía existen diferencias en cuanto a las especies presentes (Favier y col. 2002).

2.3 Mecanismos de transferencia bacteriana madre-hijo

Aunque todavía se desconocen muchos aspectos de cuál es el mecanismo exacto a través del cual las bacterias comensales pueden atravesar el epitelio intestinal y alcanzar la glándula mamaria, diversas evidencias señalan al sistema inmunológico como clave en esta transferencia. La hipótesis que se plantea es que el transporte de bacterias de la microbiota intestinal de la madre a la leche, se lleva a cabo a través de la misma ruta enteromamaria mediante la cual células del sistema inmune de origen intestinal son transportadas a la glándula mamaria (Roux y col. 1977; Newburg y col. 2007). Este mecanismo implicaría una íntima relación entre la microbiota y el sistema inmune durante el transporte.

Es posible que las células dendríticas residentes en el epitelio intestinal sean capaces de proyectar sus dendritas hacia la luz intestinal abriéndose paso a través de las uniones intercelulares con el objetivo de captar microorganismos (Martin y col. 2004; Pérez y col. 2007). Se ha demostrado que si bien los macrófagos destruyen de forma rápida a las bacterias comensales, en el caso de las células dendríticas las bacterias permanecen viables durante días (Macpherson y col. 2004a; Macpherson y col. 2004b). Incluso se puede pensar que la proximidad y abundancia de bacterias en la superficie de la mucosa y de su capacidad de adherirse a la misma, esté afectando a la más que probable opción de que

las bacterias sean avistadas, tanto por las células M como por muestreo directo por células dendríticas (figuras 2-1 y 2-2).

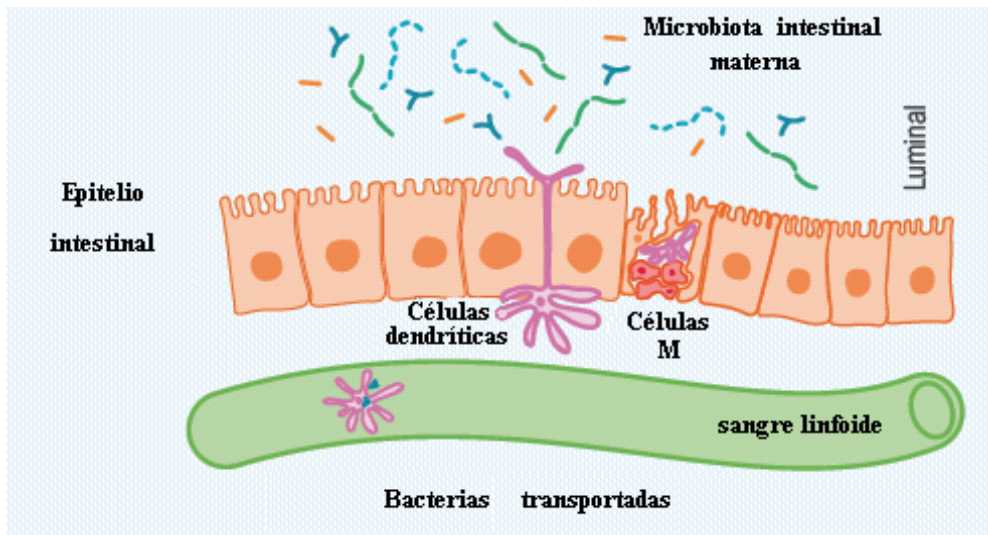


Figura 2-2. Posible mecanismo mediante el cual las bacterias evitan ser fagocitadas.

La fisiología y organización del epitelio intestinal incluye una larga y entramada red de folículos linfoides por donde circula el sistema linfático, y existe una continua circulación de células del sistema inmune por dichos folículos (Martín y col 2003). Una vez dentro, las células dendríticas pueden diseminarse por el sistema linfático hasta otras localizaciones como las glándulas mamarias, de esta forma también se transportarían los microorganismos que viajan con estas células desde la zona del epitelio intestinal hasta las glándulas mamarias. Además, en el periodo de lactancia existe una colonización por parte de numerosas células del sistema inmune gracias a procesos selectivos regulados por hormonas lactogénicas (Bertotto y col 1991). Este proceso, responsable de la abundancia de estas células del sistema inmune en la leche, sería utilizado para la translocación de las bacterias comensales. Se ha demostrado que el mecanismo de translocación bacteriana es un proceso fisiológico que se ve incrementado durante el embarazo y la lactancia, y que existe la presencia de material genético de una gran diversidad de bacterias intestinales en células sanguíneas y de la leche (Pérez y col. 2007; Rodríguez JM, 2014). Por tanto, la translocación de bacterias comensales a la glándula mamaria no es una transferencia pasiva sino un proceso activo en el que el sistema inmune juega un papel clave.

Algunas bacterias comensales no invasivas pueden atravesar la mucosa intestinal mediante un mecanismo dirigido por las células dendríticas existentes en la lámina propia. Estas células pueden abrir las zonas de oclusión existentes entre enterocitos adyacentes, proyectar dendritas al exterior y captar

bacterias viables para introducirlas en la lámina propia, preservando la integridad de la barrera intestinal mediante la expresión de las proteínas que integran las zonas de oclusión (Figuras 2-1 y 2-3), manteniendo la integridad del epitelio intestinal (Rescigno y col. 2001). Normalmente el sistema inmunitario defensivo del hospedador destruye las bacterias que se han translocado, pero se han observado bacterias comensales viables durante varios días unidas a las células dendríticas (Macpherson y col. 2004a; Macpherson y col. 2004b). Este hecho permitiría a las bacterias propagarse por el sistema linfoide asociado a las mucosas y llegar a mucosas distantes, incluida la glándula mamaria de las mujeres embarazadas y/o lactantes.

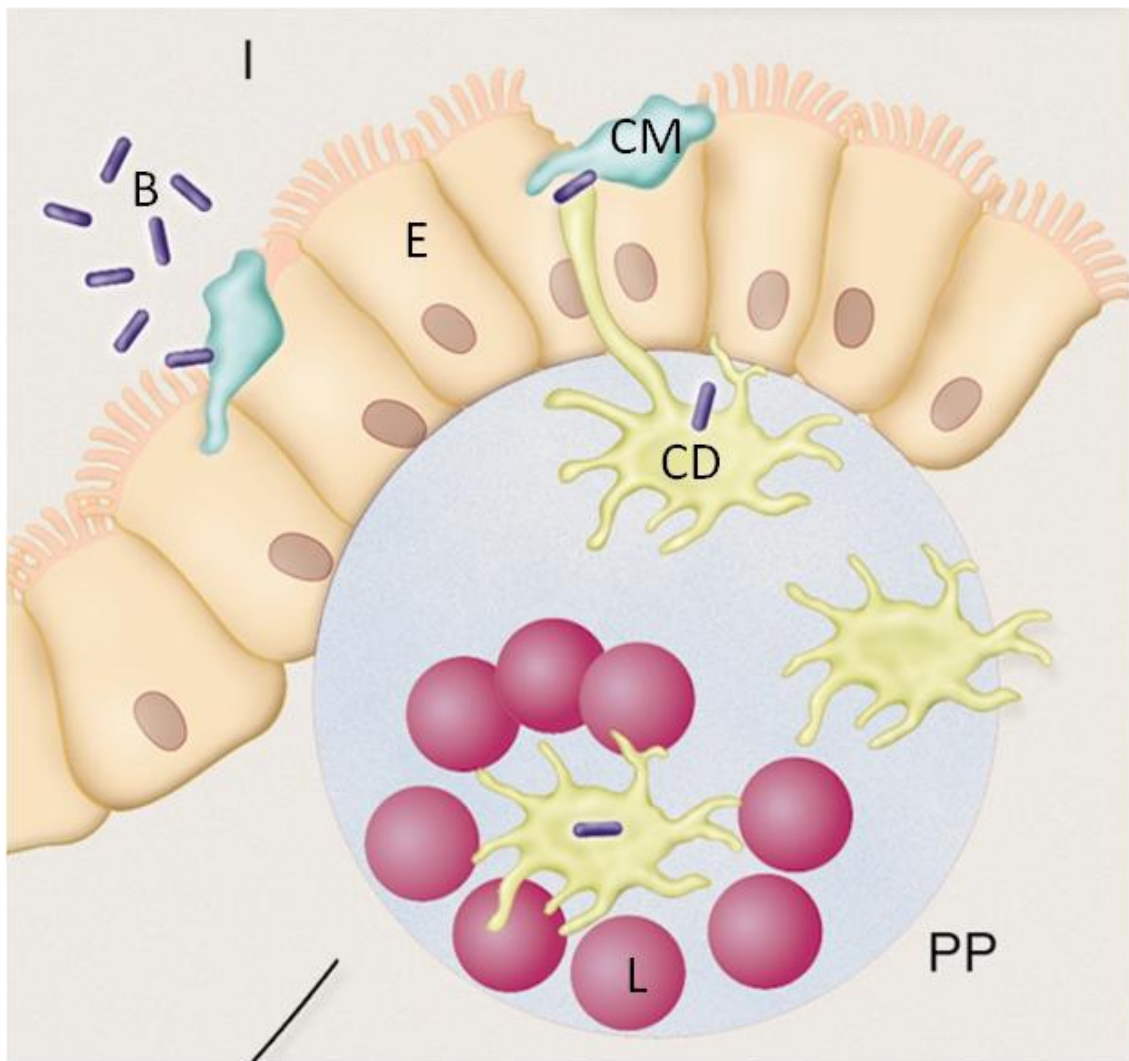


Figura 2-3. Translocación bacteriana a través de la mucosa intestinal. B, bacterias; CM, Célula M; E, Enterocito; CD, Célula Dendrítica; PP, Placa de Peyer; L, Linfocito. Fuente: Uhlig y col. 2003.

3. LA MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.

3.1 Composición y distribución

El aparato digestivo humano está compuesto por cinco partes bien diferenciadas: la cavidad orofaríngea, el esófago, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso. Las tres últimas partes conforman el tracto gastrointestinal, con funciones de digestión, absorción, secreción y de barrera. Además, cada vez se reconoce más su importancia como órgano endocrino y constituye el mayor órgano del sistema inmunitario humano.

La mucosa del tracto gastrointestinal humano está colonizada por una comunidad microbiana extremadamente compleja. De hecho, se estima que contiene aproximadamente 10^{14} células procariotas, cifra diez veces mayor que la suma de todas las células eucariotas del cuerpo humano (Qin y col. 2010). Toda la comunidad microbiana, incluyendo bacterias, hongos, virus y otras especies microbianas, proporciona una capacidad enzimática tremenda y, por lo tanto, juega un papel fundamental en la fisiología del huésped (Sonnenburg y col. 2016).

El ensamblaje de la microbiota intestinal comienza antes y durante el proceso de parto y evoluciona con la alimentación durante la infancia. Por tanto, la colonización inicial normal del intestino es un evento importante en el ajuste del recién nacido al medio extrauterino (Molloy y col. 2012). Diversos factores influyen en la colonización intestinal inicial: constitución genética del recién nacido, tipo de parto, uso de antibióticos, tipo de alimentación y el hecho de que la madre se encuentre bajo estrés o exprese un padecimiento inflamatorio, entre otros (Penders y col. 2006; Dominguez-Bello y col. 2010; Cho y col. 2012; Hesla y col. 2014; Serrano y col. 2016) (figura 3-1). Más aún, nuestro concepto dogmático sobre nichos estériles en el cuerpo humano (p.e. la placenta) se ve desafiado actualmente por la reciente evidencia acerca de cómo estos nichos podrían funcionar como repositorio de una biomasa activa que alberga un microbioma único (Prince y col. 2015).

La microbiota oral, intestinal, vaginal y del tracto urinario materno contribuye a la siembra inicial de la microbiota neonatal. Con el paso a través del canal de parto, los recién nacidos son inoculados al nacer y en conjunción con un número variable de exposiciones posteriores se establecerá la composición de su microbiota inicial, que evolucionará en el tiempo, siendo entre los 2 y 3 años indistinguible de la microbiota del adulto (Yatsunenکو y col. 2012). Publicaciones recientes llegan a la

conclusión de que la microbiota de los nacidos por cesárea es diferente a la de los nacidos por vía vaginal, diferencias que todavía pueden verse a los 3 meses de edad pero no con posterioridad, a los 6 y 12 meses de edad (Hesla y col. 2014; Rutayisire y col. 2016).

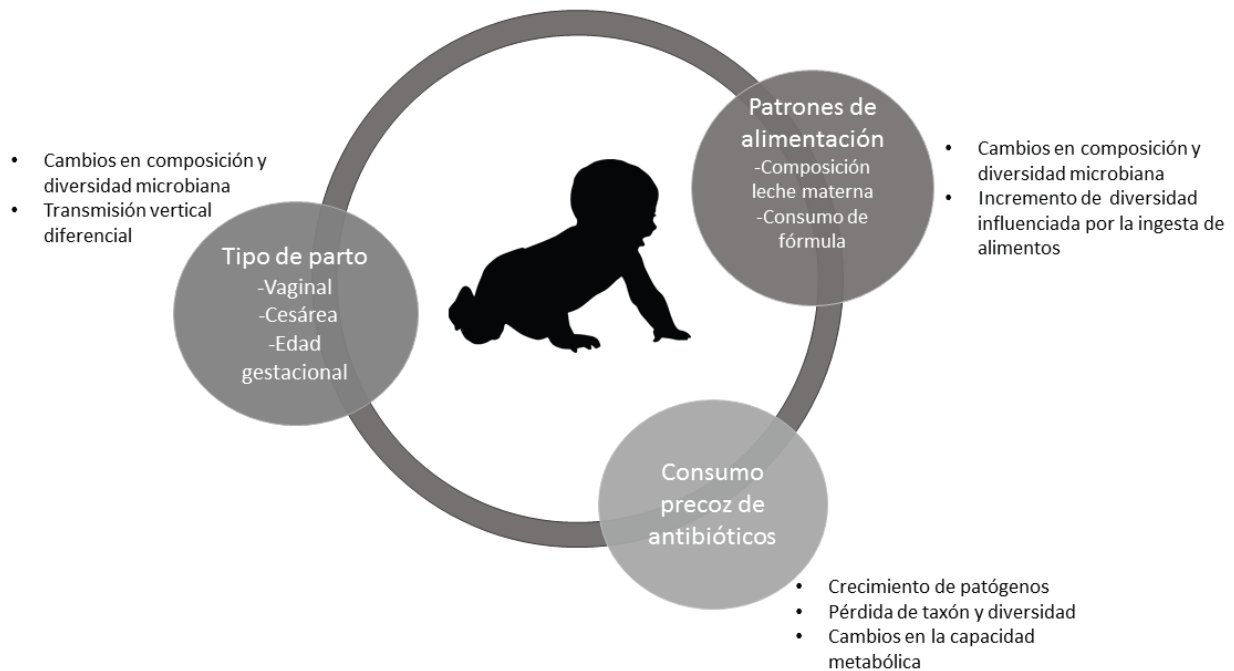


Figura 3-1. Factores que influyen sobre el desarrollo de la microbiota en niños. Tomado de Serrano y col. 2016.

La diversidad taxonómica de las bacterias intestinales ha sido objeto de numerosas investigaciones durante las últimas décadas. En los años 70 y 80, el estudio de la microbiota intestinal dependía de la continua mejora en los procedimientos de enriquecimiento y en los sistemas para la generación de ambientes anaerobios. Los aislados se identificaban y caracterizaban mediante combinación de diversos ensayos fenotípicos. Con el avance tecnológico que llevó a la aparición de técnicas de secuenciación de última generación, que emplean, entre otros, la filogenia del gen ARN ribosomal 16S, la composición del microbioma y su papel en la salud y en la enfermedad, ha sido sujeto de investigación activa durante los últimos años. Con estas nuevas herramientas aplicadas directamente a heces humanas y su comparación con secuencias cultivables, se ha estimado que sólo un 30% de las especies detectadas se corresponden con especies previamente aisladas e identificadas con las técnicas clásicas de cultivo (Wilson y col. 1996; Suau y col. 1999; Hayashi y col. 2002). El proyecto Microbioma Humano estableció un punto de partida para evaluar el papel del microbioma en la salud y en la

enfermedad describiendo la composición del microbioma en diversos sitios del cuerpo en adultos sanos provenientes de EE. UU. (Turnbaugh y col. 2007). En la actualidad se conoce que, en el adulto, la microbiota intestinal está integrada por unas 1.000 especies que aportan 2 millones de genes aproximadamente (Rajilić-Stojanović y col. 2014), y está bien establecido que cinco *phyla* bacterianas, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacterias* y *Verrucomicrobia*, son componentes dominantes de la microbiota intestinal humana (Tremaroli y col. 2012). Más del 90% de las poblaciones bacterianas son anaerobios y gram-negativos e incluyen los géneros predominantes *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, y *Fusobacterium* (Guarner y col. 2003).

La microbiota aumenta en cantidad y complejidad a medida que avanzamos por el tracto gastrointestinal (figura 3-2). Así, en individuos sanos, la marcada acidez del ambiente estomacal (pH-3) mayoritariamente permite el desarrollo de estreptococos y lactobacilos (10^3 - 10^4 UFC/g) y de algunas levaduras (Tannock, 1995; Rastall, 2004). Además, *Helicobacter pylori* también coloniza la mucosa gástrica de un porcentaje considerable de individuos, si bien se necesita la concurrencia de diversos factores para que cause manifestaciones clínicas. En el intestino delgado, los principales factores limitantes para el establecimiento de los microorganismos son los movimientos peristálticos y la secreción de los jugos pancreático y biliar. Aquí, los niveles aumentan progresivamente, desde 10^4 - 10^5 UFC/g en el duodeno, donde nuevamente son mayoritarios los lactobacilos y los estreptococos (Simon y col. 1984; Rastall RS, 2004), hasta más de 10^8 UFC/g en la región distal del íleon. Las especies cultivables más numerosas en esta última región son las bifidobacterias, enterobacterias, *Bacteroides* y *Fusobacterias* (Croucher y col. 1983; Simon y col. 1984).

En el intestino grueso, el pH está más próximo a la neutralidad, la velocidad de tránsito es mucho más lenta y las secreciones biliar y pancreática están mucho más diluidas. Por ello, no es de extrañar que el mayor número de bacterias en el tracto gastrointestinal humano resida precisamente en este segmento, donde constituye entre el 35 y el 55% del volumen del contenido sólido (Stephen y col. 1980). Además, existe un ambiente muy reductor y desprovisto de oxígeno por lo que la mayoría de las poblaciones bacterianas son anaerobias estrictas y constituyen lo que se denomina la microbiota dominante, caracterizada por concentraciones del orden de 10^9 - 10^{12} UFC/g. Dentro de esta microbiota, el género *Bacteroides* es uno de los más abundantes (Tannock, 1995). También son dominantes otros microorganismos gram-positivos no esporulados pertenecientes a los géneros *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Ruminococcus* (Conway, 1995). Los bacilos gram-positivos

esporulados están representados esencialmente por los clostridios. En concentraciones inferiores aparecen poblaciones de bacterias anaerobias facultativas como enterobacterias, enterococos, lactobacilos y estreptococos, que constituyen la microbiota subdominante, con tasas comprendidas entre 10^5 y 10^8 UFC/g (Holzapfel y col. 1998) y que, a pesar de su menor número, pueden resultar esenciales para la homeóstasis microbiana en el intestino grueso. Algunas levaduras también se encuentran formando parte de esta microbiota, aunque en concentraciones relativamente bajas (10^2 - 10^4 UFC/g). (Tannock, 1995; Satokari y col. 2001; Rastall, 2004).

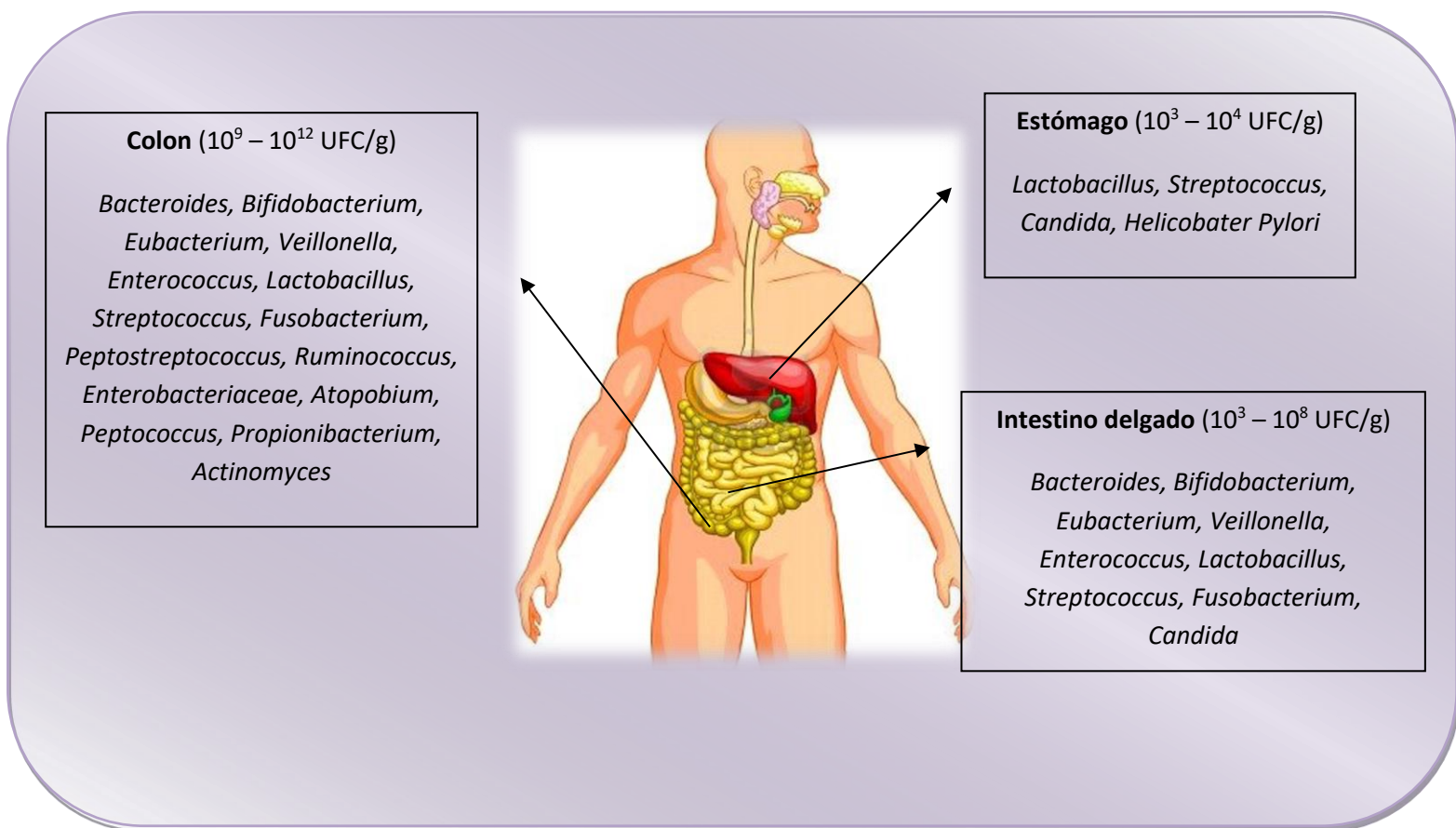


Figura 3-2. Distribución de las poblaciones bacterianas en el tracto gastrointestinal

Un componente principal que influye sobre las bacterias colonizadoras del intestino se relaciona con el contenido de oligosacáridos de la leche materna (Newburg y col. 2007). No se digieren en el intestino delgado, sino que llegan al colon, donde las bacterias colónicas los fermentan, lo cual lleva a un

medio ácido y a un aumento en los ácidos grasos de cadena corta. Esto deriva en un refuerzo de las bacterias promotoras de la salud y en un estímulo temprano de la defensa inmune de la mucosa. De hecho, un estudio clínico ha demostrado un nexo directo con los niveles de IgAs en el intestino durante los primeros meses de vida y el número presente de organismos de *B. infantis*, así como una relación inversa entre los niveles de *B. fragilis* y la citoquina inflamatoria IL-6, lo cual sugiere un efecto antiinflamatorio (Sjögren y col. 2009). Investigaciones subsiguientes han sugerido que la nutrición con leche materna es crítica para la colonización temprana del intestino neonatal y para el desarrollo de la función inmunoprotectora de la mucosa (Garrido y col. 2011; Chichlowski y col. 2012).

3.2 Funciones de la microbiota intestinal humana

En los últimos años, se ha incrementado notablemente el interés por el estudio del complejo ecosistema microbiano del tubo gastrointestinal humano. Esto se debe a que las poblaciones microbianas ejercen una gran influencia sobre muchas características bioquímicas, fisiológicas e inmunológicas del hospedador en el que residen (Gill, 1998; Salminen y col. 1998), existiendo una relación cada vez más clara entre la microbiota intestinal y la salud (Hart y col. 2002; Guarner y col. 2003; Noverr y col. 2004). Los investigadores han expandido de manera exponencial nuestra comprensión de las funciones que la microbiota colonizadora efectúa en la función del cuerpo humano, en particular la intestinal y la inmune (Medzhitov, 2001).

3.2.1 Función metabólica

Un papel fundamental de la microbiota del tracto gastrointestinal es la fermentación de carbohidratos, fuente de energía mayoritaria en el colon. Estos carbohidratos (25-60 g/día) provienen de nuestra dieta y por diversas razones no han podido ser digeridos. En su defecto pueden ser fermentados por la acción de las enzimas bacterianas. La mayoría de estos carbohidratos son de origen vegetal, como por ejemplo el almidón resistente, celulosas, hemicelulosas, pectinas, inulina, oligosacáridos que no son digeridos, azúcares y alcoholes no absorbidos (Cummings y col. 1996; Cummings y col. 2001).

La degradación de los carbohidratos es un proceso en el que participan activamente muchas poblaciones de la microbiota. De esta forma, se liberan como productos de la fermentación bacteriana AGCC (piruvato, acetato y butirato) (Chaia y col 2008). Los AGCC actúan directa e indirectamente sobre las células del epitelio intestinal y participan en el control de varios procesos

metabólicos. El butirato es metabolizado rápidamente por los enterocitos del colon, sirviéndoles como fuente de energía. Además, esta molécula es capaz de estimular la diferenciación celular y de disminuir el riesgo de cáncer de colon mediante la inducción de apoptosis de células tumorales (O'Keefe y col. 2009). Por su parte, el acetato y el propionato llegan intactos al hígado a través de la vena porta. El acetato se incorpora a los procesos de colesterogénesis y lipogénesis en el hígado, mientras que el propionato actúa como inhibidor competitivo del acetato hacia el interior de los hepatocitos. Este fenómeno parece contribuir a la disminución de la lipogénesis y colesterogénesis hepática (Al-Lahham y col. 2010). Por otra parte, los AGCC participan en la regulación de la respuesta inmune sistémica a través de la regulación de la actividad de los linfocitos T, y se pueden unir a receptores específicos y actuar como mensajeros, por medio de los cuales las bacterias intestinales pueden intervenir en la modulación del metabolismo del huésped (Cani y col. 2016; Jones, 2016).

La microbiota intestinal posee también un papel clave en la eliminación de las sales biliares que llegan al colon, las cuales se modifican a través de la acción de la microbiota gracias a un proceso de desconjugación por acción de hidrolasas bacterianas (Lundeen y col. 1990; Grill y col. 1995), y mediante un proceso de deshidroxilación de los ácidos biliares dando lugar a los llamados ácidos biliares secundarios (Wells y col. 2000; Ridlon y col. 2006). Un exceso de ácidos biliares secundarios en el intestino grueso incrementa el riesgo de padecer cáncer de colon (Nagengast y col. 1995) y una excesiva desconjugación puede conducir a una malabsorción de grasas y vitaminas liposolubles.

Otra de las funciones de tipo metabólica de la microbiota intestinal sería la de la producción de vitaminas, como es el caso de la vitamina K, la vitamina B12, la biotina, el ácido fólico y el ácido pantoténico, y la síntesis de aminoácidos a partir del amoníaco y de la urea (O'Keefe, 2008).

Una consecuencia asociada con la modificación de la microbiota intestinal es la aparición de cambios metabólicos negativos en el huésped, como la obesidad y la diabetes tipo 2. En ratones axénicos se ha demostrado la existencia de una resistencia al desarrollo de obesidad inducida por la dieta, y que la microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en la promoción de la adiposidad (Bäckhed y col. 2007). En dicho modelo animal, el fenotipo asociado con obesidad ha demostrado ser transmisible a través del trasplante de una microbiota "obesa", destacando el papel activo de las comunidades bacterianas sobre esta condición (Turnbaugh y col. 2006; Ridaura y col. 2014).

Los primeros estudios sobre composición de la microbiota intestinal en obesos, pusieron de manifiesto que existían diferencias entre individuos no obesos y obesos, con mayor número de *Firmicutes* y *Actinobacterias* en estos últimos, junto a la disminución en *Bacteroidetes* (Ley y col. 2006; Turnbaugh y col. 2006), si bien estudios posteriores han puesto de manifiesto una mayor diversidad bacteriana (Khan y col. 2016). Además, varios microorganismos intestinales se han asociado con la obesidad o delgadez (Million y col. 2012; Million y col. 2013). Por otra parte, la exposición temprana a antibióticos se ha relacionado estrechamente con el desarrollo de obesidad en animales y en humanos (Cox y col. 2015), y se ha descrito un efecto de la exposición prenatal a antibióticos sobre el peso de los neonatos y el desarrollo de obesidad durante la infancia (Ajslev y col. 2011; Vidal y col. 2013). Más aún, dosis subterapéuticas de antibióticos han demostrado incrementar la adiposidad en ratones tras el destete, lo que podría ser extrapolado a problemas metabólicos a largo plazo en lactantes (Cho y col. 2012). Sin embargo, los diversos estudios realizados tanto en humanos como en animales claramente indican que existen controversias sobre la relación entre la microbiota intestinal y la obesidad.

La diabetes es un desorden metabólico en donde se observan elevados niveles de glucosa en la sangre, principalmente debido a la resistencia a la insulina y/o a la secreción inadecuada de ésta. Funciones propias de la microbiota parecen ser claves para mejorar la sensibilidad a la insulina (Allin y col. 2015). De hecho, pacientes con diabetes tipo 2 (DM2) se caracterizan por presentar una disbiosis intestinal, y una menor abundancia de bacterias productoras de butirato (Qin y col. 2012). Más aún, individuos obesos, los cuales presentan una menor riqueza en su microbiota fecal, se han relacionado con un mayor grado de inflamación y a la vez una menor sensibilidad a la insulina (Le Chatelier y col. 2013). De esta manera, el perfil alterado en la microbiota de individuos obesos podría modular la permeabilidad intestinal e incrementar la secreción de endotoxinas llevando a la inflamación crónica y al posterior desarrollo de DM2 (Everard y col. 2013). Igualmente, se han descrito diferencias en la microbiota de pacientes con DM2 frente a adultos no diabéticos, evidenciando una menor diversidad microbiana fecal (Larsen y col. 2010). Estas diferencias podrían reflejarse incluso en los recién nacidos, cuya composición bacteriana poder estar muy influenciada por el estado de la diabetes materna (Hu y col. 2013), sugiriendo que la microbiota característica de dicha patología podría ser transferida de la madre a sus hijos.

En el caso de la diabetes de tipo 1 (DM1), a pesar de ser una enfermedad de tipo autoinmune, factores adicionales como la microbiota intestinal podrían cumplir un papel clave en esta patología. Se

han descrito diferencias significativas en ciertas comunidades bacterianas responsables de la modulación de DM1 en el momento del debut de la enfermedad (Roesch y col. 2009). Más aún, se han descrito diferencias en la composición de la microbiota de niños con DM1 frente a niños sanos, presentando un menor número de bacterias fundamentales para mantener la integridad intestinal, lo que podría explicar la alterada permeabilidad intestinal observada en este tipo de pacientes (Murri y col. 2013).

3.2.2 Función protectora frente a las infecciones

Las bacterias que componen la microbiota intestinal forman un determinado nicho ecológico el cual crea una especie de barrera, imposibilitando de esta forma la entrada o la implantación de bacterias extrañas al ecosistema, que pueden ser de tipo patógenas o patógenas oportunistas (Lievin y col. 2000; Chow y col. 2010). De hecho, la microbiota constituye la primera línea de defensa frente a las infecciones. Existen diferentes mecanismos que contribuyen a esta protección, entre los cuales se incluyen la producción de sustancias antimicrobianas (Fukuda y col. 2011; Hammami y col. 2013), la competición por los nutrientes (Hooper y col. 1999) y la competencia por los sitios de unión a las células epiteliales del intestino (Bernet y col. 1994; Brook y col. 1999).

3.2.3 Función inmunológica

El tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT) constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmunitario, siendo capaz de discriminar de forma eficaz entre patógenos invasivos y antígenos inocuos. Estructuralmente, el GALT está dividido en dos compartimentos (figura 3-3):

- Un compartimento organizado que posee numerosos folículos linfáticos o placas de Peyer, además de nódulos linfáticos mesentéricos y que sería el inductor de la respuesta inmunitaria.
- Un compartimento difuso, que es el gran efector de la respuesta inmunitaria, formado por poblaciones linfocitarias intercaladas entre las células epiteliales (linfocitos intraepiteliales) o en la lámina propia (linfocitos de la lámina propia).

Las placas de Peyer están formadas por agregados linfoides y se encuentran situadas en la mucosa intestinal. El tejido linfoide se encuentra separado del lumen intestinal por una monocapa de

células, denominadas FAE, donde nos encontramos células columnares también llamados enterocitos, las células M y las células goblet, estas últimas responsables de la secreción de mucus.

Las células M forman parte de la FAE. Son un tipo celular implicado en la captación y presentación de antígenos y microorganismos al tejido linfóide presente en la lámina propia, siendo este punto el inicio de la respuesta inmunitaria (Neutra, 1998). Este tipo celular juega un papel fundamental a la hora de la presentación de antígenos en la luz intestinal. Su citología presenta una serie de invaginaciones en las superficies vasolaterales donde se puede llevar a cabo el contacto entre los antígenos y los linfocitos o macrófagos que puedan encontrarse alojados en dichas invaginaciones. El acceso de las células del sistema inmunitario a estas invaginaciones se produce en respuesta a señales producidas por las células M ante la presencia de ciertas macromoléculas o de microorganismos (Neutra, 1998). Por lo tanto, las células M facilitan el contacto entre los antígenos y microorganismos presentes en el lumen intestinal y el sistema inmunitario.

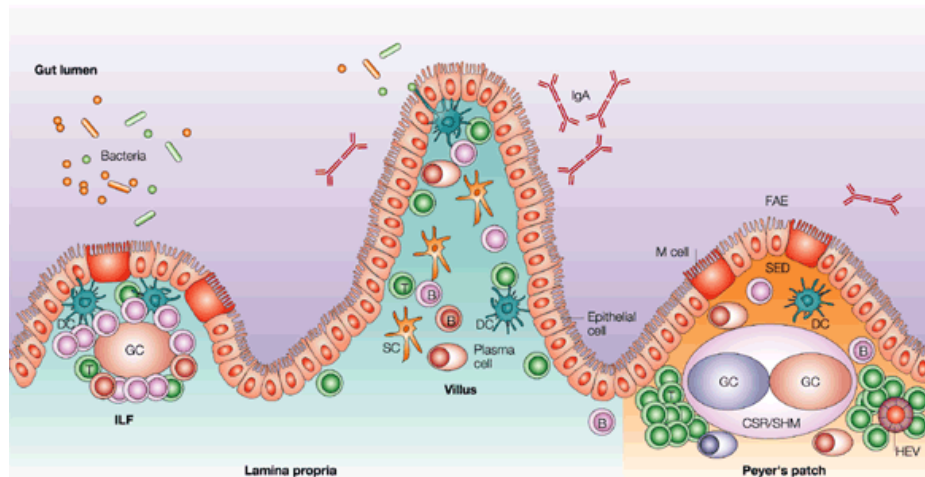


Figura 3-3. Representación de los elementos que componen el GALT, tanto el GALT de tipo difuso como el organizado (Adaptado de Ramiro-Puig y col. 2008)

Por debajo de la FAE, se encuentra una zona subepitelial en la que están presentes las células dendríticas y algunos macrófagos. Existen también otras áreas en los folículos linfáticos en los que predominan linfocitos T, principalmente del tipo T helper, células dendríticas maduras y macrófagos. Por otro lado en las placas de Peyer se localizan folículos compuestos por linfocitos B precursores celulares de la producción de IgA. Esta IgA favorece la defensa de la mucosa intestinal frente a patógenos, induce tolerancia hacia la microbiota intestinal normal y contribuye a mantener un ambiente antiinflamatorio (Gutzeit y col. 2014).

Formando parte del GALT difuso, se localizan los linfocitos IEL (del inglés *intraepithelial lymphocytes*). Estos linfocitos se encuentran situados entre los enterocitos, justo por debajo de las uniones formadas por las proteínas de unión y bajo la membrana basal. La unión entre los enterocitos y los linfocitos IEL no está del todo definida existiendo una relación de unos 20 IELS por cada 100 enterocitos existentes en la mucosa intestinal. Si se considera que la superficie intestinal correspondiente a la mucosa es de unos 400 m² podremos darnos cuenta de la elevada tasa de linfocitos presentes en la mucosa y de que representan una elevada población dentro de nuestro sistema inmunitario. En cuanto sus propiedades histoquímicas, casi todos los IELS son de tipo CD3+ (células pan-t). Un 5-15 % de estas células expresan CD4 (fenotipo inductor) mientras que las restantes expresan CD8 (fenotipo supresor). Esta proporción es distinta a la que encontramos en otras zonas, ya que en la sangre y en la lámina propia el fenotipo CD4+ es mayoritario (Jarry y col. 1990)

Además de estos componentes, en la lámina propia se localizan poblaciones de células plasmáticas productoras de IgA, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas y otras células, todas ellas situadas entre el epitelio y la capa muscular (Lefrançois y col. 2006). Las células dendríticas de la lámina propia migran hacia los órganos linfoides secundarios para regular la inmunidad intestinal; también desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la IgAs luminal y en la inducción del desarrollo de los linfocitos Treg (Sun y col. 2007).

La respuesta inmunitaria celular y humoral en el recién nacido difiere cualitativa y cuantitativamente de la respuesta en adultos. De hecho, la infancia temprana se caracteriza por una mayor vulnerabilidad a las infecciones resultado de una reducción en la funcionalidad y en el número de leucocitos (linfocitos T y B, células NK, línea mieloide) (Holladay y col. 2000). La capacidad de respuesta del sistema inmunitario de los neonatos está influenciada por su sensibilización a antígenos en el útero y durante el periodo postnatal. El establecimiento de la microbiota intestinal determina el desarrollo del sistema inmunitario (Grönlund y col. 2000), actuando como un regulador esencial en las respuestas inmunitarias (Noverr y col. 2004). Teniendo en cuenta la dimensión tanto cualitativa como cuantitativa que supone la presencia de antígenos procedentes de la microbiota intestinal, su efecto va a marcar la maduración de la respuesta inmunológica del niño.

Los patrones moleculares conservados, ya sea expresados en la superficie de las bacterias simbióticas o secretados en el intestino, pueden interactuar con receptores de reconocimiento de patrones (PRR), los cuales se expresan sobre o dentro de las células epiteliales y linfoides para iniciar la

transducción y transcripción de señales de un conjunto de moléculas que median la defensa del huésped o las actividades metabólicas dentro del intestino (Walker, 2013). La familia mejor conocida de PRR es la del receptor tipo toll (*Toll-like Receptors*, TLR), que consta de nueve receptores ya identificados, los que interactúan con componentes de bacterias gram-positivas y gram-negativas para mediar ambas la inmunidad innata y adaptativa, lo mismo que otras funciones celulares de la barrera de mucosa (Kaplan y col. 2011). Los microorganismos colonizadores comensales y patológicos pueden interactuar con los TLR en la célula epitelial intestinal para evocar una respuesta inmune innata. De igual manera, las bacterias colonizadoras pueden accionar la inmunidad adaptativa para crear la homeostasis inmune dentro del intestino (Walker, 2013).

Este efecto se pone claramente de manifiesto al comparar la respuesta inmunológica de animales axénicos con la de animales con una microbiota convencional. Los estudios realizados en animales axénicos han demostrado que la ausencia de microbiota tiene un marcado efecto no sólo sobre la fisiología del intestino, incluyendo morfología, secreción de mucus, digestión y metabolismo, sino también sobre la función del sistema inmunitario. Estos animales presentan un gran número de alteraciones en el sistema inmunitario, tales como una baja densidad de células linfoides en la mucosa intestinal, estructuras foliculares linfocitarias pequeñas y una baja concentración de inmunoglobulinas circulantes en la sangre (Falk PG y col. 1998; Butler JE y col. 2000; Tannock, 2001). En los animales axénicos la respuesta inmunitaria de las mucosas está poco desarrollada, presentando placas de Peyer hipoplásicas que contienen pocos centros germinales así como un reducido número de células plasmáticas productoras de IgA y células T CD4+ en lámina propia (Macpherson y col. 2004b). La inmadurez del sistema inmunitario de estos animales demuestra que la microbiota intestinal podría actuar como un importante estímulo inmunogénico permitiendo la maduración del GALT (Helgeland y col. 1996; Shroff y col. 1995).

Las funciones anómalas de las células del sistema immune pueden ser revertidas en pocas semanas tras la colonización de los animales axénicos con bacterias comensales procedentes de los animales normales. De hecho, la colonización de estos animales conduce al incremento en el número de células T CD4+, la inducción de IgAs y de las inmunoglobulinas séricas y al desarrollo del GALT correctamente organizado (Moreau y col. 1978; Hooper y col. 2001; Macpherson y col. 2004b). Por tanto, la colonización intestinal se revela como un punto clave en la maduración del sistema inmunológico. Aunque estos modelos de colonización experimental se llevan a cabo en animales, el

proceso en neonatos es muy similar, siendo un buen modelo para estudiar los mecanismos involucrados en la maduración del sistema inmunológico (Mackie y col. 1999).

Un aspecto importante a comentar es el hecho de que no todas las bacterias comensales ejercen el mismo efecto sobre el sistema inmunitario. Por ejemplo, grupos bacterianos como *Bacteroides* y *Escherichia* parecen tener un efecto muy potente (Grönlund y col. 2000; Karlsson y col. 2004). El hecho de que una bacteria sea gram-positiva o gram-negativa influye también de forma importante a la hora de inducir un determinado perfil de citoquinas indicando que la composición de la microbiota va a determinar la modulación de la respuesta inmunitaria (Hessle y col. 2000; Karlsson y col. 2002).

Además de los aspectos cualitativos y cuantitativos, los tiempos en los que se produce la colonización parecen jugar también un papel importante. En animales de experimentación se ha demostrado que el mecanismo de tolerancia oral frente a antígenos alimentarios solamente se estructura de forma correcta si la microbiota se instaure durante el periodo neonatal pero no si la colonización se lleva a cabo más tarde (Sudo y col. 1997).

Interacción de las bacterias comensales con el sistema inmunitario.

Las células presentadoras de antígenos como monocitos, macrófagos y células dendríticas son las responsables de detectar agentes extraños presentando las estructuras antigénicas a las células T, activando de esta manera la respuesta inmune específica. Las células dendríticas son las células presentadoras más potentes, con capacidad para presentar a los linfocitos Tnaïve (th0) nuevas proteínas antigénicas. Además, una característica importante es que mientras que en los macrófagos las bacterias comensales son eliminadas rápidamente, en el caso de las células dendríticas las bacterias pueden sobrevivir incluso horas pudiendo acompañar a estas células hasta los nódulos linfáticos mesentéricos (Karlsson y col. 2002; Macpherson y col. 2004b).

Dependiendo de cuales sean los componentes de la cepa bacteriana que estimula a las células dendríticas, su activación dará lugar a la producción de un medio con citoquinas que permite que las células Th0 maduren a Th1, Th2, Th17 y células Treg (Banchereau y col. 1998; Sun y col. 2007; Caricilli y col. 2014). Las células Th1 median la inmunidad celular y las Th2 la humoral, incluida la elaboración de anticuerpos IgE. Las células Th17 interviene en la inflamación tisular y la depuración de patógenos extracelulares. Es probable que la subclase más estudiada de Th en los últimos años sea la de las células

Treg (TR1 y Th3) que facilitan la tolerancia oral y la antiinflamación (Steinman y col. 2003; Bashir y col. 2004).

Los monocitos y las células dendríticas reconocen motivos conservados en las bacterias a través de los receptores TLR, junto con otros receptores de conocimiento. La activación de las células presentadoras de antígenos a través de los TLR inicia una cascada de señales que culminan en la activación de factores de transcripción tales como NF- κ B, que finalmente conducen a la secreción de citoquinas y moléculas coestimuladoras (Akira y col. 2001). Para estudiar la especificidad de los TLR se han utilizado componentes aislados de microorganismos observándose que, por ejemplo, el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram-negativas es reconocido por TLR4. Otros compuestos microbianos como peptidoglicano y lipoproteínas de la pared bacteriana de bacterias gram-positivas y gram-negativas son reconocidos por TLR2. El ADN bacteriano, caracterizado por frecuentes zonas de dinucleótidos CG no metilados, también es reconocido por uno de estos receptores, el TLR-9 (Janssens y col. 2003) (Figura 3-4).

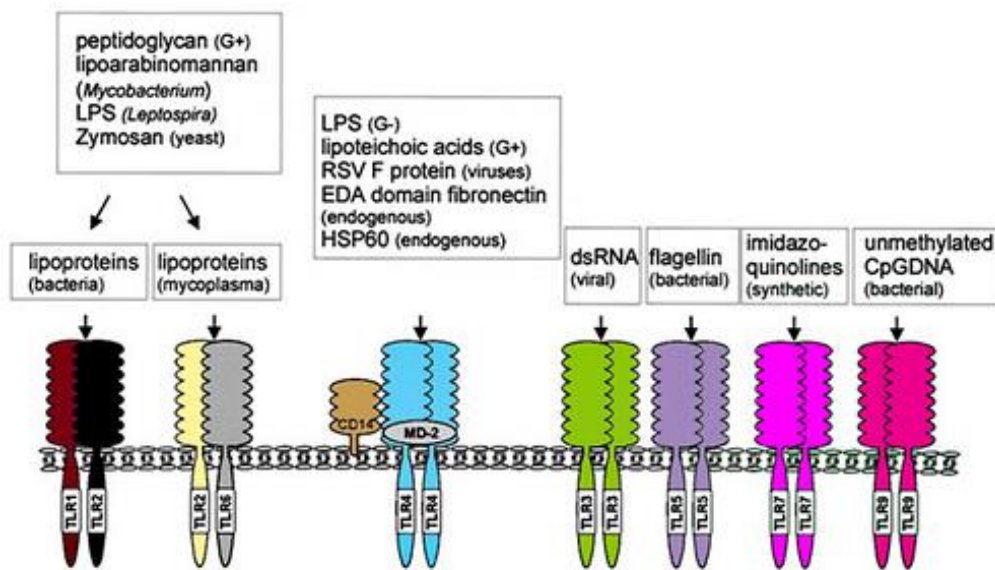


Figura 3-4. Receptores TLR (tomado de Janssens y col. 2003)

Bajo condiciones fisiológicas el sistema inmunitario no reacciona de forma agresiva frente a las bacterias comensales, favoreciéndose de esta manera la tolerancia oral (Magalhaes y col. 2007; Artis, 2008). Los antígenos o las bacterias no patógenas que interactúan con las células dendríticas de la

submucosa vía los TLR, en presencia de bacterias colonizadoras se estimulan, de manera preferente, para producir células Treg y un microambiente especializado que facilita el desarrollo de dichas células. Éstas liberan TGF- β , una citosina oral tolerogénica, que reduce la respuesta de Th1, Th2 y Th17 hacia los antígenos y las bacterias (Spiekermann y col. 2001). Se ha demostrado que la tolerancia oral no puede lograrse en animales axénicos y estos animales deben ajustarse a la colonización total durante el periodo neonatal para que la tolerancia sea efectiva. La tolerancia oral requiere un TLR4 para ser efectiva, y la tolerancia puede romperse con el uso extenso de antibióticos de amplio espectro (Walker, 2013). Estas observaciones sugieren que la colonización intestinal inicial normal se requiere para establecer la tolerancia oral y, ésta, una vez lograda, puede romperse con el uso excesivo de antibióticos.

En el tracto gastrointestinal se produce la principal interacción entre el sistema inmunitario del hospedador y los microorganismos, ya sean comensales o patógenos. Es, por tanto, en la mucosa intestinal donde el sistema inmunológico aprende a distinguir entre los microorganismos comensales y patógenos y cómo reaccionar ante ellos. La alteración de la colonización bacteriana inicial conduce a una disbiosis de la microbiota intestinal, la cual a su vez lleva a la disfunción inmune y a un aumento en la tendencia a padecer enfermedad inflamatoria (Mai y col. 2009; Round y col. 2009; Weng y col. 2013) e incluso cáncer, ya que se han observado propiedades anticarcinogénicas de la microbiota intestinal (Gao y col. 2016). De hecho, se ha demostrado que padecimientos crónicos, como la alergia y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), se asocian con una microbiota intestinal diferente de la de los controles emparejados por edad y sin enfermedad (Mazmanian y col. 2008). En la actualidad, se ha sugerido que la influencia de la dieta (dieta occidental) sobre la colonización bacteriana puede ser un factor importante en el cambio de paradigma de la carga de enfermedades en los países desarrollados, de ser de predominio infeccioso a ser mediada por inmunidad (autoinmune y alergia) (De Filippo y col. 2010).

En un intento de explicar el incremento en la prevalencia de estas enfermedades se propuso la hipótesis de la higiene. Esta hipótesis mantiene que las infecciones durante la infancia previenen el desarrollo de las enfermedades alérgicas. En los países desarrollados los niños están menos expuestos a las infecciones lo que se traduce en un mayor riesgo de alergias (Strachan, 2000). Durante el periodo prenatal y neonatal predomina una respuesta inmunológica de tipo Th-2. El creciente contacto con microorganismos y la instauración de la población bacteriana en el intestino estimula el desarrollo de la respuesta Th1 (Adkins y col. 2001). Finalmente estos mecanismos conducen a un equilibrio entre ambos

tipos de respuesta inmunológica, un balance Th1/Th2. Sin embargo no solo estas respuestas están involucradas pues otros subgrupos de células T con potente capacidad inmunomoduladora son capaces de controlar ambas respuestas Th1 y Th2. Es el caso de las células Treg y Th3, consideradas como factores clave en la homeostasis del sistema inmunológico (Akbari y col. 2003).

El asma es una de las enfermedades inflamatorias crónicas más prevalentes en la niñez en los países desarrollados. Su etiología es compleja e incluye tanto predisposición genética como exposiciones ambientales. En los niños que no están genéticamente predispuestos, se ha descrito una estrecha relación entre la exposición a antibióticos a temprana edad, que son capaces de modificar la composición y diversidad de bacterias intestinales, con un riesgo aumentado para el desarrollo de asma, independientemente de si la exposición ocurre intraútero, en el periodo neonatal o a través de la leche materna (Azad MB y col. 2012). Un estudio canadiense (Subbarao y col. 2015) demostró que los lactantes con riesgo de desarrollar asma, presentaban una composición y diversidad de la microbiota diferente a los 3 meses de edad, con niveles disminuidos de los géneros bacterianos *Lachnospira*, *Veillonella*, *Faecalibacterium* y *Rothia*. La inoculación de estos géneros bacterianos en un modelo murino de asma mostró una disminución de la inflamación en la vía aérea, correlacionando directamente a la microbiota con la protección de la vía aérea (Arrieta y col. 2015)

Al igual que las enfermedades alérgicas, la EII es una patología de etiología compleja, donde confluyen susceptibilidades genéticas (polimorfismos en NOD2 e IL-23R, entre otros), alteraciones a nivel inmune, cambios en los patrones de colonización de bacterias intestinales y una serie de factores ambientales. En niños, se ha descrito una disminución en la diversidad de la microbiota si bien no se han observado cambios significativos en la composición a nivel de *phylum* (Hansen y col. 2012), y que a un mayor nivel de inflamación intestinal existe una reducción en la riqueza de la microbiota, caracterizada por la abundancia de bacterias gram-positivas, particularmente de los grupos *Clostridium* clústeres IV y XIVa (Kolho y col. 2015). El análisis de la secuenciación del gen 16s ribosomal ha permitido identificar patrones bacterianos asociados con patología que distinguen pacientes controles de pacientes con EII (Papa y col. 2012). Recientemente, también en pacientes pediátricos, se ha demostrado una correlación entre el estado de la enfermedad y el aumento en la abundancia de las familias *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae*, y *Fusobacteriaceae*, y una disminución en los grupos de *Erysipelotrichales*, *Bacteroidales*, y *Clostridiales* (Gevers y col. 2014). Otro hallazgo importante de este último estudio fue la disminución en la diversidad de especies con cambios en la composición de la

microbiota en los pacientes con enfermedad de Crohn expuestos a antibióticos, demostrando un efecto de amplificación de la disbiosis microbiana observada en los pacientes con enfermedad de Crohn.

3.3. El eje intestino-cerebro

El eje intestino-cerebro (EIC) es un sistema de comunicación bidireccional que integra funciones tanto del cerebro como gastrointestinales. Por lo tanto, es importante tener en cuenta la influencia que el cerebro ejerce sobre el contenido microbiano del intestino y, a la inversa, tener en cuenta que la microbiota intestinal influye sobre la actividad del cerebro del huésped (Collins y col. 2009; Cryan y col. 2012). Investigaciones recientes han identificado que ciertas bacterias y componentes bacterianos en la luz del intestino pueden modular los sistemas sensoriales intestinales intrínsecos y extrínsecos, con consecuencias para la peristalsis, la nocicepción, la química del cerebro y del estado de ánimo (Forsythe y col. 2016), y existen fuertes indicios de que el estrés tiene un efecto significativo sobre la composición y función de la microbiota intestinal. Del mismo modo, se ha demostrado que las bacterias entéricas afectan profundamente la función cerebral (especialmente del hipotálamo y de la amígdala), la emoción y el comportamiento (El Aidy y col. 2015; Cong y col. 2016).

Hay una clara evidencia de que la comunicación entre la microbiota intestinal y el SNC se lleva a cabo a través de vías endocrinas e inmunológicas, el sistema nervioso autónomo y el sistema nervioso entérico, formando colectivamente redes complejas (Figura 3-5). Existen distintas vías de comunicación, ninguna mutuamente excluyente, entre la microbiota intestinal y el SNC: 1) la estimulación de las respuestas inmunes del huésped que conducen a diversos patrones de la activación de citoquinas sistémica; 2) la síntesis de metabolitos neuroactivos absorbibles, incluyendo neurotransmisores; 3) alteraciones en los circuitos neuronales por los efectos microbianos directos sobre el sistema nervioso entérico, con la transmisión a través de vías vagales del SNC; y 4) el eje neuroendocrino hipotálamo-pituitario-adrenal (Montiel-Castro y col. 2013; Galland, 2014; El Aydi y col. 2015; Wang y col. 2016).

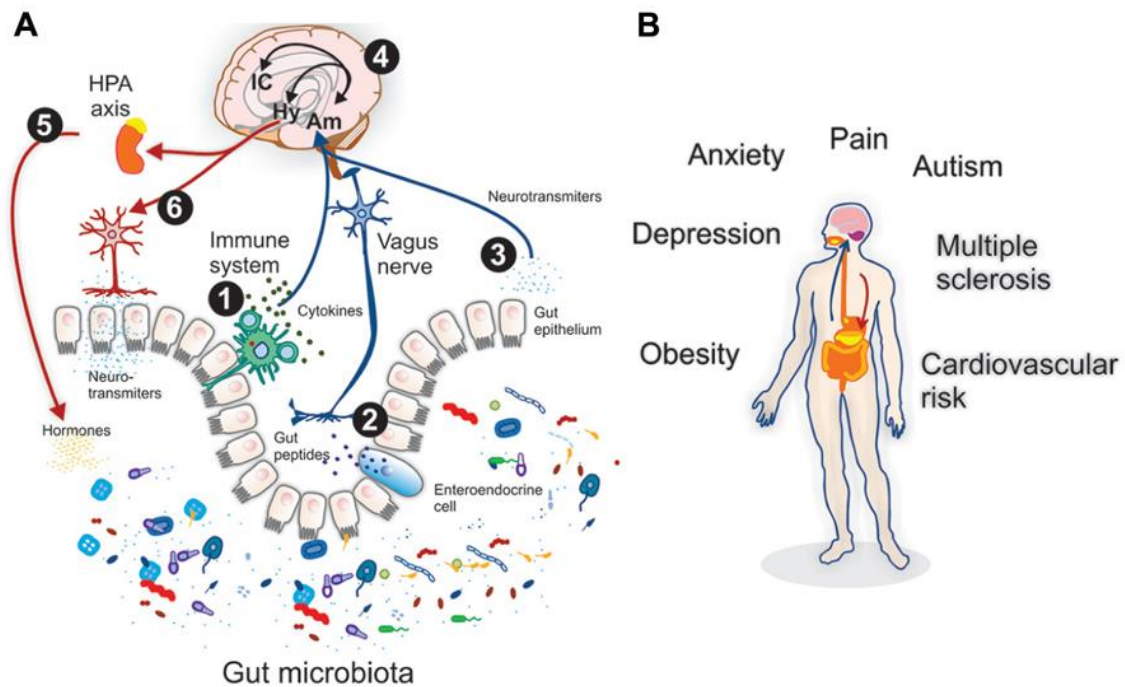


Figura 3-5. Eje cerebro-intestino-microbiota (Tomado de Montiel-Castro y col. 2013)

(A) Interacciones bidireccionales entre la microbiota intestinal y el sistema nervioso central (CNS): (1) los linfocitos pueden percibir la luz intestinal y liberar internamente citoquinas que pueden tener acciones endocrinas o paracrinas, (2) terminales neuronales sensoriales, como en el nervio vago podrían ser activadas por péptidos intestinales liberados por células enteroendocrinas, (3) los neurotransmisores o sus precursores pueden alcanzar el epitelio intestinal y sus metabolitos pueden tener efectos endocrinos o paracrinos. (4) se ha descrito una red neural que implica constantemente la amígdala (Am) y el córtex insular (IC) como principales integradores de entradas viscerales. La activación del hipotálamo (Hy) inicia el brazo eferente (flechas rojas): (5) corticosteroides, la liberación como resultado de la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), modula la composición de la microbiota intestinal. (6) la activación neuronal eferente puede incluir el llamado "reflejo anti-inflamatorio colinérgico" y / o la activación simpática, ambos neurotransmisores clásicos que pueden afectar directamente a la composición de la microbiota intestinal. (B) condiciones de salud: la evidencia reciente y creciente sugiere que varias condiciones de salud pueden ser afectadas por la microbiota intestinal.

Los estudios clínicos han puesto de manifiesto distintos efectos patológicos de las bacterias comensales del intestino sobre el SNC y han llevado a los investigadores a especular sobre los posibles efectos adversos atribuidos a la disbiosis y al aumento de la permeabilidad intestinal (Galland, 2014). A su vez, la actividad del SNC y neuroendocrino, y en particular la respuesta al estrés, pueden influir en la composición de la microbiota intestinal alterando diferencialmente el crecimiento de especies

bacterianas y la producción de factores de virulencia bacteriana (Galland, 2014). En experimentación animal, se ha demostrado que el estrés durante la vida temprana (separación materna) produce cambios en la microbiota de la descendencia y que esto se asocia con un aumento de corticosterona y citoquinas inflamatorias (O'Mahony y col. 2009) y con un aumento de la permeabilidad intestinal y una vulnerabilidad del tracto gastrointestinal a los estímulos inflamatorios (Varghese y col. 2006). En los ratones axénicos, el eje hipotálamo-pituitario-adrenal no se desarrolla con normalidad y conlleva una alteración de la capacidad de respuesta al estrés y una reducción del factor neurotrófico derivado del cerebro en el hipocampo (Tillisch, 2014). Estas anomalías se pueden corregir o atenuar con la colonización de los ratones axénicos por bacterias intestinales normales o con la ingesta de bacterias específicas en los primeros estadios de la vida (Desbonnet y col. 2010; Forsythe y col. 2016).

La microbiota intestinal, el sistema de señalización cerebro-intestino y su interacción con los receptores genéticos, han demostrado estar relacionados con la salud infantil y el desarrollo de la conducta corto y largo plazo. Un reciente estudio mediante resonancia magnética funcional muestra que la ingestión de bacterias probióticas altera la función cerebral en los seres humanos, demostrando una relación aparente entre la microbiota intestinal y la salud humana (Tillisch y col. 2013; Collins y col. 2013). Se ha desarrollado el modelo teórico "Reglamento de salud Infantil y desarrollo en la vida temprana por el microbiana genómico del huésped", para proponer que la interacción huésped-microbiota está involucrada en la salud infantil y en los mecanismos del desarrollo (Figura 3-6). En los primeros años de la vida, el papel de la microbiota intestinal en la salud y en la enfermedad ha adquirido gran importancia a causa de la evidencia de que la microbiota intestinal puede influir en muchos aspectos del comportamiento humano (Cong y col. 2016). Un estudio reciente en los bebés con cólicos del lactante ha demostrado una reducción de la diversidad bacteriana en general, un aumento de la densidad de las *Proteobacterias* y una disminución de *Bacterioides*, en comparación con los bebés sanos (Mayer y col. 2015). Así pues, el contenido microbiano del intestino, posiblemente influenciado por factores tales como el contacto materno, es fundamental para el desarrollo de una respuesta adecuada a la tensión en la vida temprana, así como en el desarrollo posterior.

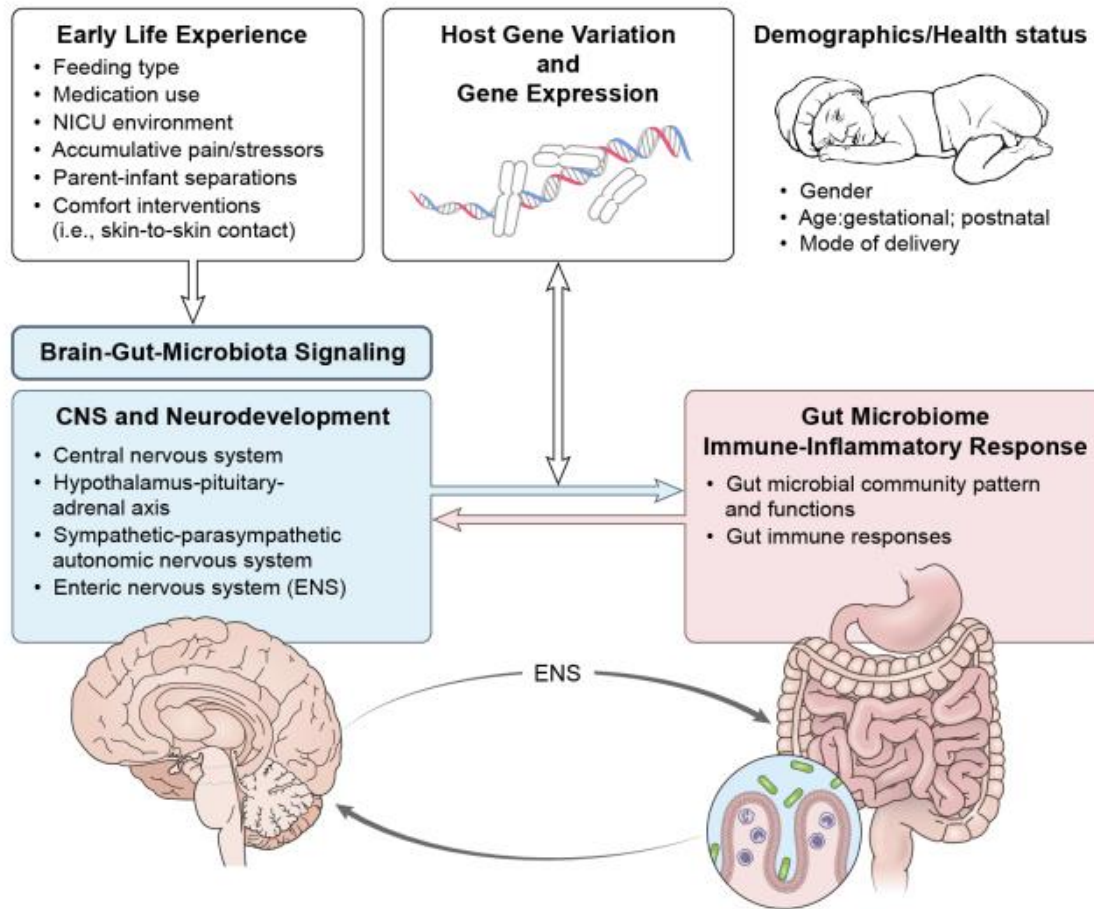


Figura 3-6. Regulación de la salud infantil y el desarrollo en la vida temprana por el microbioma genómico del hésped. ENS = sistema nervioso entérico (Tomado de Coong y col. 2016).

Los recién nacidos prematuros se diferencian de los recién nacidos a término en que son particularmente vulnerables a los efectos del estrés / dolor. El estrés activa el eje hipotálamo-pituitario-adrenal y el sistema nervioso simpático, lo que aumenta la permeabilidad intestinal que permite a las bacterias y antígenos bacterianos cruzar la barrera epitelial, activar la respuesta inmune de la mucosa y alterar la composición del microbioma (Bonaz BL y col. 2012) y, además, el estrés oxidativo en el intestino modula el proceso de establecimiento del microbioma en los recién nacidos prematuros (Arbolea S y col. 2013). Por otra parte, el dolor repetido puede contribuir a los cambios a largo plazo en los sistemas de estrés generalizado, incluyéndola alteración de los niveles de las hormonas del estrés, después del alta de la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (Grunau RE y col. 2007).

4. PROBIÓTICOS.

4.1 Definición

La modulación de la microbiota intestinal para mejorar la salud se ha efectuado empíricamente desde tiempos ancestrales, existiendo noticias del empleo de alimentos fermentados para el tratamiento de infecciones gastrointestinales ya en el año 76 a.C. Pero no fue hasta principios del siglo XX cuando se empezó a relacionar la presencia de bacterias en esos alimentos con ciertos efectos beneficiosos para la salud de los hospedadores, especialmente cuando padecían infecciones intestinales (Rodríguez Gómez, 2006). Por aquel entonces, se publicó “Prolongation of Life” de Elle Metchnikoff, a quien le fue concedido el Premio Nobel en 1908, un libro que ejerció una gran influencia en la comunidad científica y en el que se postulaba que las bacterias que intervenían en la fermentación del yogur contribuían al mantenimiento de la salud mediante la supresión de las “fermentaciones de tipo putrefactivo” de la microbiota intestinal y que ésta era la causa de la longevidad de los campesinos búlgaros, grandes consumidores de yogur.

A lo largo del siglo XX se empezó a utilizar el término de probiótico para denominar a estas bacterias. Posiblemente, el término “probiótico” fue empleado por primera vez por Vergio en 1954 (Maldonado Lozano y col. 2014c), cuando comparaba los efectos adversos (“*antibiotika*”) que los antibióticos ejercían sobre la microbiota intestinal con las acciones beneficiosas (“*probiotika*”) ejercidas por otros factores que no pudo determinar.

Numerosas definiciones fueron surgiendo durante décadas hasta que finalmente un comité conjunto FAO/OMS (2002) los ha definido como “microorganismos vivos que ingeridos a dosis definidas ejercen efectos beneficiosos para la salud”. Esta definición pone de manifiesto tres aspectos claves para que un producto pueda considerarse probiótico:

- *Debe contener un microorganismo vivo:* Aunque investigaciones recientes demuestran que ciertos microorganismos pueden ejercer efectos beneficiosos incluso cuando se ingieren muertos o inactivados, a día de hoy no hay evidencias suficientes como para clasificarlos como probióticos.
- *Número definido:* La preparación o producto deberá contener uno o varios microorganismos bien definidos y en número conocido y suficiente.

- *Deben ejercer un beneficio para la salud:* Esto implica que dichos beneficios deben ser demostrados mediante pruebas científicas generalmente aceptadas.

Entre los microorganismos empleados con fines probióticos, los lactobacilos y las bifidobacterias ocupan, con diferencia, el lugar más destacado pero también se utilizan bacterias que pertenecen a otros géneros, como *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*, o levaduras, principalmente *Saccharomyces boulardi* (Tabla 4-1). Sin embargo no todos los lactobacilos pueden ser considerados probióticos ni todos los probióticos van a ejercer las mismas funciones. Los efectos de cada cepa son únicos, y no deben de extrapolarse a otras cepas. Por ello se requiere de un proceso de caracterización que permita definir con precisión el potencial probiótico de cada cepa.

Además del concepto de probióticos, existen dos términos íntimamente relacionados, los prebióticos y los simbióticos. Los prebióticos son aquellos carbohidratos no digeribles que favorecen de forma selectiva el crecimiento de ciertas bacterias consideradas como beneficiosas para el hospedador. La combinación de al menos un probiótico y un prebiótico se denomina “simbiótico”. Es interesante señalar que la combinación de probiótico y prebiótico en un mismo producto puede tener un efecto sinérgico y conferir beneficios mayores que los que cada uno de los componentes por separado (Romeo y col. 2010; Grimoud y col. 2010).

Tabla 4-1. Especies bacterianas utilizadas como probióticos.

| Lactobacillus | Otras bacterias lácticas | Bifidobacterium | Otros microorganismos |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------|---|
| <i>L. acidophilus</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>B. adolescentis</i> | <i>Bacillus cereus</i> var. <i>Toyo</i> |
| <i>L. amylovorus</i> | <i>Enterococcus faecium</i> | <i>B. animalis</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>L. casei</i> | <i>Lactococcus lactis</i> | <i>B. bifidum</i> | <i>Propionibacterium freundereichi</i> |
| <i>L. crispatus</i> | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | <i>B. breve</i> | <i>Sacharomices cerevisiae</i> |
| <i>L. delbrueckii</i> | <i>Pediococcus acidilactici</i> | <i>B. infantis</i> | <i>Streptococcus boulardi</i> |
| <i>L. fermentum</i> | <i>Streptococcus termophilus</i> | <i>B. longum</i> | |
| <i>L. helveticus</i> | <i>Sporolactobacillus inulinus</i> | | |
| <i>L. Gallinarum</i> | | | |
| <i>L. Gasseri</i> | | | |
| <i>L. Johnsonii</i> | | | |
| <i>L. paracasei</i> | | | |
| <i>L. plantarum</i> | | | |
| <i>L. reuteri</i> | | | |
| <i>L. rhamnosus</i> | | | |

4.2 Criterios de selección

La selección de una nueva cepa probiótica no se presenta como un trabajo fácil, ya que aunque se considera que los organismos probióticos producen una serie de efectos beneficiosos para el hospedador que los consume, no son todavía bien conocidos los mecanismos implicados en dicha acción. Además no existe una uniformidad de criterio para la selección de estas bacterias y tampoco se puede extrapolar el efecto probiótico de una cepa a otra aunque sea de la misma especie. Teniendo en cuenta todos estos inconvenientes, son muchos los test que se han utilizado para tratar de identificar los efectos beneficiosos de un microorganismo (ensayos de adhesión al epitelio intestinal, de inhibición del crecimiento de patógenos, actividades enzimáticas potencialmente beneficiosas, etc...). (Collins y col. 1998; Holzapfel y col. 1998; Mattila- Sandholm y col. 1999; Ouwehand y col. 1999; Tuomola y col. 2001).

Sin embargo, de acuerdo con el grupo de trabajo FAO/OMS (2002) los test de los que se dispone actualmente no son adecuados para predecir la funcionalidad de un probiótico en el intestino. Según este grupo de expertos la selección de un probiótico debería basarse en tres criterios fundamentales:

A. Criterios de seguridad

- Taxonomía*: Bioquímica (API CH50, SDS-proteína) y genética (16S, RAPD, AFLP, TGGE)
- Producción de aminas biógenas*: tyramida, histamina, cadaverina, putrescina
- Actividades enzimáticas*: degradación mucinas, actividad proteolíticas, glucuronidasa
- Resistencia a antibióticos*: MIC values
- Otros*: infectividad, determinantes de virulencia

B. Criterios Funcionales

- Resistencia a digestión*: pH ácido, sales biliares, modelo de digestión global
 - Capacidad fermentativa*: azúcares, oligosacáridos, azúcar complejos y fibras
 - Colonización intestinal*: adhesión a células intestinales (caco-2, HT-29), competición
 - Producción de metabolitos*: SCFA, cobalamine, glutathione, oligosacáridos, PUFAs
 - Sustancias antimicrobianas*: actividad bactericida, reuterina, bacteriocinas, H₂O₂
-

·*Parámetros inmunológicos*: citocinas, activación linfocitaria, fagocitosis

·*Otros*: estimulación de mucinas, supervivencia en leche

C. Criterios Tecnológicos

·*Crecimiento*: medios mínimos, velocidad de generación, producción de biomasa

·*Resistencia*: calor, sales, pH ácido, presión osmótica

4.3 Seguridad

Como ya se ha mencionado, el consumo de microorganismos en alimentos fermentados data de varios miles de años. Dado que se ingerían como componentes de los alimentos, eran considerados seguros en base a una larga historia de uso y asumiendo que formaban parte de la microbiota comensal. Sin embargo, el gran potencial de la modulación de la microbiota para la conservación o la mejora del estado de salud, ha despertado un creciente interés en la industria, fundamentalmente alimentaria y farmacéutica, por el desarrollo de nuevos probióticos. En este contexto, no todas las cepas que se han comercializado han demostrado científicamente su seguridad y funcionalidad, y esto, junto con varias publicaciones que relacionaban el consumo de determinados probióticos con algunas situaciones patológicas en personas muy debilitadas o inmunocomprometidas, ha despertado cierta inquietud en la comunidad científica sobre la seguridad de estos microorganismos (Boyle y col. 2006; Doron y col. 2015). Lo que esto sugiere es que la seguridad de los probióticos debe estudiarse cepa a cepa, mediante pruebas científicas validadas. Ni la seguridad ni la eficacia de una cepa concreta debe extrapolarse a otras cepas, aunque éstas pertenezcan al mismo género o incluso a la misma especie si bien no se ha hallado ningún gen inequívocamente relacionado con patogenicidad en los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, incluyendo los aislados asociados con sepsis u otros efectos adversos (Vesterlund y col. 2007).

En EEUU los microorganismos utilizados en alimentos son considerados bien como aditivos, en cuyo caso su uso tiene que ser aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*), o bien como ingredientes, para lo cual es imprescindible que el microorganismo esté clasificado como GRAS

(*Generally Recognized As Safe*) (Maldonado Lozano y col. 2014c). La Unión Europea (UE) ha tratado de dotar a los países miembros de un marco legislativo referente a la seguridad de microorganismos en la alimentación humana, a través del status QPS (*Qualified Presumption of Safety*). Se trata de un sistema de preevaluación de la seguridad de un microorganismo basado en cuatro pilares: identidad establecida, historia de uso y evidencia científica disponible, posible patogenicidad y aplicación final. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) actúa como comité científico de la UE y es quien evalúa la información científica disponible de cada cepa y publica una lista de microorganismos con el status QPS, que no tendrían por qué ser sometidos a más estudios de seguridad. El Comité Científico de la EFSA elaboró una lista de microorganismos considerados seguros basados en su historial de uso en alimentación a los que se les ha concedido la condición de QPS (Tabla 4-2). Esta lista incluye 74 especies de microorganismos que incluyen 35 especies de *Lactobacillus* y 5 de *Bifidobacteria* (EFSA, 2013).

Existen distintos tipos de ensayos *in vitro* e *in vivo* que evalúan la seguridad a la hora de seleccionar un probiótico, al mismo tiempo que se puede evaluar la dosis adecuada a la hora de la comercialización y del consumo (European Commission, 2003; EFSA, 2006; Maldonado Lozano J y col. 2014c). Como en cualquier otra bacteria, las bacterias ácido lácticas pueden actuar como reservorio de genes de resistencia a antibióticos, similares a los encontrados en bacterias patógenas para los humanos (Mathur y col. 2005). Pero más que portar la resistencia, lo que es más interesante es la capacidad de transferencia de la misma a otras bacterias del entorno, principalmente bacterias patógenas, por medio de elementos móviles como plásmidos o transposones (Mathur y col. 2005).

La posible transferencia de factores de resistencia a antibióticos de cepas probióticas a cepas potencialmente patógenas, podría acarrear un problema de salud grave al conferir a estas bacterias patógenas las herramientas para defenderse frente a los tratamientos antibióticos, pudiendo resultar en infecciones de difícil resolución. Por otro lado, aunque los casos de infecciones causadas por cepas probióticas son contados y están generalmente asociados a condiciones patológicas del consumidor, es importante que la cepa probiótica sea susceptible a antibióticos que puedan ser utilizados ante una eventual infección. Por ello, los expertos recomiendan que las bacterias probióticas no presenten multiresistencias y sean sensibles a baterías de antibióticos habituales, además se plantea el requisito de que ningún probiótico posea la capacidad de albergar en su genoma genes relacionados con la resistencia a antibióticos, que puedan ser transferidos.

Tabla 4-2. Lista de bacterias QPS (Qualified Presumption of Safety).


|  | | QPS 2013 update |
|---|--|--|
| <i>Propionibacterium freudenreichii</i> | <i>Propionibacterium acidipropionici</i> | |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | | |
| Bacillus | | |
| Species | | Qualifications^(a) |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | <i>Bacillus fusiformis</i> | Absence of toxigenic activity and acquired antibiotic resistance genes. |
| <i>Bacillus atrophaeus</i> | <i>Bacillus lentus</i> | |
| <i>Bacillus clausii</i> | <i>Bacillus licheniformis</i> | |
| <i>Bacillus coagulans</i> | <i>Bacillus megaterium</i> | |
| | <i>Bacillus subtilis</i> | |
| <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | <i>Bacillus mojavensis</i> | Absence of toxigenic activity and acquired antibiotic resistance genes. |
| | <i>Bacillus pumilus</i> | |
| | <i>Bacillus vallismortis</i> | |
| Gram-Negative Bacteria | | |
| Species | | Qualifications^(a) |
| <i>Gluconobacter oxydans</i> | | QPS only applies when the species is used for vitamin production. |
| <i>Xanthomonas campestris</i> ^(b) | | QPS only applies when the species is used for the production of xanthan gum. |
| Yeasts^(a) | | |
| Species | | Qualifications |
| <i>Candida cylindracea</i> ^(b) | | QPS only applies when the species is used for enzyme production. |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> | | |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | | |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | |
| <i>Komagataella pastoris</i> | | QPS only applies when the species is used for enzyme production. |
| <i>Lindnera jadinii</i> | | |
| <i>Ogataea angusta</i> | | |
| <i>Saccharomyces bayanus</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> † | Absence of resistance to antimycotics used for medical treatment of yeast infections in cases where viable cells are added to the food or feed chain. In the case of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> this qualification applies for yeast strains able to grow above 37°C. |
| | <i>Saccharomyces pastorianus</i> | |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | | |
| <i>Wickerhamomyces anomalus</i> | | QPS only apply when the species is used for enzyme production. Absence of resistance to antimycotics used for medical treatment of yeast infections in cases where viable cells are added to the food or feed chain. |
| <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (imperfect form <i>Phaffia rhodozyma</i>) | | |

Tabla 4-2. Lista de bacterias QPS (Qualified Presumption of Safety) (continuación).

QPS 2013 update

recombinant protein production and gene therapy. The safety issues related to this particular application are discussed in detail in the 2011 QPS report and elsewhere (EFSA, 2011a; Kost and Condrey, 2001).

The QPS recommendation for the family *Baculoviridae* as the highest taxonomic unit was confirmed.

10. The 2013 updated list of QPS Status recommended biological agents in support of EFSA risk assessments – 3rd revision (new addition)

The 2013 updated list of QPS Status recommended biological agents for safety risk assessments carried out by EFSA Scientific Panels and Units, as shown in Table 1 below, is undergoing a revision process in accordance with a self-task mandate of the BIOHAZ Panel. The revisions will be published as an Appendix to a Statement of the BIOHAZ Panel around every six months, with the first revision starting in December 2014 and the last revision as an Appendix to a Scientific Opinion of the BIOHAZ Panel in December 2016. The most up-to-date QPS list will be published on the web as an Appendix of the corresponding revision and also as a separate file associated with the respective revision.

Table 1: The 2013 updated list of QPS Status recommended biological agents for safety risk assessments carried out by EFSA Scientific Panels and Units – 3rd revision (new additions)

| Gram-Positive Non-Sporulating Bacteria | | | Qualifications ^(a) |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|---|
| Species | | | |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | <i>Bifidobacterium bifidum</i> | <i>Bifidobacterium longum</i> | |
| <i>Bifidobacterium animalis</i> | <i>Bifidobacterium breve</i> | | |
| <i>Carnobacterium divergens</i> ⁽¹⁾ | | | |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> ⁽²⁾ | | | QPS only applies when the species is used for amino acid production. |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | <i>Lactobacillus farciminis</i> | <i>Lactobacillus paracasei</i> | |
| <i>Lactobacillus amylolyticus</i> | <i>Lactobacillus fermentum</i> | <i>Lactobacillus paraplantarum</i> | |
| <i>Lactobacillus amylovorus</i> | <i>Lactobacillus gallinarum</i> | | |
| <i>Lactobacillus alimentarius</i> | <i>Lactobacillus gasseri</i> | <i>Lactobacillus pentosus</i> | |
| <i>Lactobacillus aviaries</i> | <i>Lactobacillus helveticus</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i> | |
| <i>Lactobacillus brevis</i> | <i>Lactobacillus hilgardii</i> | <i>Lactobacillus pontis</i> | |
| <i>Lactobacillus buchneri</i> | <i>Lactobacillus johnsonii</i> | <i>Lactobacillus reuteri</i> | |
| <i>Lactobacillus casei</i> ⁽²⁾ | <i>Lactobacillus kefiranaefaciens</i> | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | |
| <i>Lactobacillus cellobiosus</i> | <i>Lactobacillus kefir</i> | <i>Lactobacillus sakei</i> | |
| <i>Lactobacillus coryniformis</i> | <i>Lactobacillus mucosae</i> | <i>Lactobacillus salivarius</i> | |
| <i>Lactobacillus crispatus</i> | <i>Lactobacillus panis</i> | <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> | |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | <i>Lactobacillus collinoides</i> | | |
| <i>Lactococcus lactis</i> | | | |
| <i>Leuconostoc citreum</i> | <i>Leuconostoc lactis</i> | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | |
| <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> | | | |
| <i>Microbacterium imperiale</i> ⁽³⁾ | | | QPS only applies when the species is used for enzyme production. |
| <i>Oenococcus oeni</i> | | | |
| <i>Pasteuria nishizawae</i> ⁽⁴⁾ | | | QPS only applies when used in pesticides to combat cyst nematodiasis. |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | <i>Pediococcus dextrinicus</i> | <i>Pediococcus pentosaceus</i> | |

Tabla 4-2. Lista de bacterias QPS (Qualified Presumption of Safety) (continuación).

| Viruses | | |
|--------------------------|--------------------|-----------------------|
| Plant viruses | | |
| Family | | Qualifications |
| <i>Alphaflexiviridae</i> | <i>Potyviridae</i> | |
| Insect viruses | | |
| Family | | Qualifications |
| <i>Baculoviridae</i> | | |

A specific representative of a QPS proposed taxonomic unit, does not need to undergo a further safety assessment other than to satisfy any of the qualifications specified if applicable. On the other hand, representatives of taxonomic units that fail to satisfy a qualification would be considered unfit for the QPS list and would remain subject to a full safety assessment, in the frame of a notification by the responsible EFSA Scientific Panel.

- (a): Generic qualification for all QPS bacterial taxonomic units: the strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antibiotics.
- (b): *Brevibacterium lactofermentum* is a synonym of *Corynebacterium glutamicum*.
- (c): The previously described species '*Lactobacillus zeae*' has been included in the species *Lactobacillus casei*.
- (d): *Saccharomyces cerevisiae*, subtype *boulardii* is contraindicated for persons with fragile health, as well as for patients with a central venous catheter in place.
- (e): Yeast synonyms commonly used in the feed/food industry:
 - Wickerhamomyces anomalus*: synonym *Hansenula anomala*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces anomalus*;
 - Lindnera jadinii*: synonyms *Pichia jadinii*, *Hansenula jadinii*, *Torulopsis utilis*;
 - Saccharomyces cerevisiae* synonym: *Saccharomyces boulardii*;
 - Saccharomyces pastorianus*: synonym *Saccharomyces carlsbergensis*;
 - Komagataella pastoris*: synonym *Pichia pastoris*;
 - Ogataea angusta*: synonym *Pichia angusta*;
 - Debaromyces hansenii*: synonym *Candida famata*.
- (f): Microorganisms recommended in the Panel Statement published in December 2014.
- (g): Microorganism recommended in the Panel Statement published in June 2015.
- (h): Microorganisms recommended in this Panel Statement published in December 2015.

4.3.1. Resistencia a antibióticos

Para valorar el fenómeno de resistencia se propuso la técnica de los MIC (concentración mínima inhibitoria). Gracias a esta técnica se obtienen valores correspondientes a la sensibilidad de una cepa a un determinado antibiótico (EFSA, 2012) (Tabla 4-3). En el caso de superar estos valores, demostrando una cualidad de resistencia frente a un determinado antibiótico, se deberían realizar investigaciones que probasen la transferibilidad de esta resistencia a otras bacterias, o en su defecto una búsqueda de genes relacionados con la resistencia en el genoma de la cepa (Klare y col. 2007; Bhardwaj y col. 2010; EFSA, 2012).

4.3.2 Actividades metabólicas

Los probióticos tienen la capacidad de transformar componentes alimentarios o secreciones biológicas en otros compuestos que podrían ser perjudiciales para el hospedador:

Producción de aminas biógenas. Las aminas biógenas se generan por descarboxilación de los aminoácidos y ejercen funciones fisiológicas esenciales como neurotransmisores y mediadores de la respuesta inmune. Algunos microorganismos pueden dar lugar a concentraciones muy altas de algunas aminas biógenas que pueden dar lugar a graves problemas toxicológicos, pudiendo inducir trastornos digestivos, circulatorios y respiratorios (Rodríguez, 2015).

Desconjugación de ácidos biliares para producir sales biliares secundarias (Jones y col. 2014).

Producción de ácido D-láctico, que en el pasado se ha utilizado para establecer la seguridad de un probiótico en niños, especialmente de los lactobacilos, pero que a día de hoy no parece ser un buen criterio de seguridad ya que bacterias productoras de ácido D-láctico se encuentran de forma habitual en el intestino (Muñoz-Quesada y col. 2012; Rubio y col. 2014) e incluso en la leche humana (Martin y col. 2003), y la administración de bacterias productoras de ácido D-láctico ha demostrado ser segura en niños (Connolly y col. 2005; Allen y col. 2010; Maldonado y col. 2010; López-Huertas, 2015). Sin embargo, la administración de una cepa productora de ácido D-láctico en pacientes de riesgo debe ser cuidadosamente vigilada si no está avalada por datos de seguridad en relación a este aspecto específico (Rodríguez, 2015).

Tabla 4-3. Valores correspondientes a los MIC. Valores superiores son considerados como fenómeno de resistencia por parte de la cepa (EFSA, 2012).

| | ampicillin | vancomycin | gentamicin | kanamycin | streptomycin | erythromycin | clindamycin | tetracycline | chloramphenicol |
|---|------------|----------------|------------|-----------|--------------|--------------|-------------|--------------|-----------------|
| <i>Lactobacillus</i> obligate homofermentative ^a | 1 | 2 ^b | 16 | 16 | 16 | 1 | 1 | 4 | 4 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> group | 1 | 2 | 16 | 64 | 16 | 1 | 1 | 4 | 4 |
| <i>Lactobacillus</i> obligate heterofermentative ^c | 2 | n.r. | 16 | 32 | 64 | 1 | 1 | 8 | 4 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | 2 | n.r. | 8 | 64 | 64 | 1 | 1 | 16 | 4 |
| <i>Lactobacillus</i> facultative heterofermentative | 4 | n.r. | 16 | 64 | 64 | 1 | 1 | 8 | 4 |
| <i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i> | 2 | n.r. | 16 | 64 | n.r. | 1 | 2 | 32 | 8 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | 4 | n.r. | 16 | 64 | 32 | 1 | 1 | 8 | 4 |
| <i>Lactobacillus casei /paracasei</i> | 4 | n.r. | 32 | 64 | 64 | 1 | 1 | 4 | 4 |
| <i>Bifidobacterium</i> | 2 | 2 | 64 | n.r. | 128 | 1 | 1 | 8 | 4 |
| <i>Pediococcus</i> | 4 | n.r. | 16 | 64 | 64 | 1 | 1 | 8 | 4 |
| <i>Leuconostoc</i> | 2 | n.r. | 16 | 16 | 64 | 1 | 1 | 8 | 4 |
| <i>Lactococcus lactis</i> | 2 | 4 | 32 | 64 | 32 | 1 | 1 | 4 | 8 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 2 | 4 | 32 | 64 | 64 | 2 | 2 | 4 | 4 |
| <i>Bacillus spp</i> | n.r. | 4 | 4 | 8 | 8 | 4 | 4 | 8 | 8 |
| <i>Propionibacterium</i> | 2 | 4 | 64 | 64 | 64 | 0.5 | 0.25 | 2 | 2 |
| Other Gram + | 1 | 2 | 4 | 16 | 8 | 0.5 | 0.25 | 2 | 2 |

n.r. not required.
^a including *L. delbrueckii*, *L. helveticus*
^b not required for *L. salivarius*
^c including *L. fermentum*

| | ampicillin | vancomycin | gentamicin | kanamycin | streptomycin | erythromycin | clindamycin | tylosine | tetracycline | chloramphenicol |
|-----------------------------|------------|------------|------------|-----------|--------------|--------------|-------------|----------|--------------|-----------------|
| <i>Enterococcus faecium</i> | 2 | 4 | 32 | 1024 | 128 | 4 | 4 | 4 | 4 | 16 |

| | ampicillin | gentamicin ^d | kanamycin ^d | streptomycin ^d | tetracycline | chloramphenicol | nalidixic acid | sulfonamide | trimethoprim ^d | apramycin |
|-------------------------|------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|--------------|-----------------|----------------|-------------|---------------------------|-----------|
| <i>Escherichia coli</i> | 8 | 2 | 8 | 16 | 8 | 16 | 16 | 256 | 2 | 8 |

^d Possible interference of the growth medium

4.3.3 Identificación de las cepas seleccionadas

La adecuada clasificación taxonómica de los probióticos es un aspecto fundamental con importantes connotaciones en la seguridad y en los aspectos legales de los mismos. El grupo de trabajo FAO/OMS (FAO/WHO, 2001) preconiza que los microorganismos probióticos deben ser clasificados de acuerdo al Código Internacional de Nomenclatura y depositados en una colección de cultivos reconocida (en España la más reconocida es la Colección Española de Cultivos Tipo, que asigna un código a cada cepa depositada precedida de las siglas de la colección, CECT). La identificación genética del microorganismo debe llevarse a cabo con métodos como la hibridación ADN/ARN o la secuenciación del ARN16s. Esta identificación genética permite la correcta clasificación del microorganismo.

4.3.4. Estudios en animales

Las pruebas en animales han sido consideradas tradicionalmente como una parte esencial en la evaluación de la seguridad de cualquier preparado que se pretenda administrar a humanos. No obstante, los modelos animales también son objeto de controversia por las connotaciones éticas inherentes y porque frecuentemente los datos de seguridad obtenidos no son directamente extrapolables a la especie humana (Sanders y col. 2010). Los estudios de toxicidad en animales sí son generalmente aceptados como una herramienta muy fiable para analizar la toxicidad aguda de un compuesto. Hasta la fecha, los estudios de toxicidad oral aguda, subcrónica y crónica de probióticos en modelos estándar no han mostrado efectos adversos, incluso cuando se han administrado a grandes dosis (hasta 10.000 veces mayores que las consumidas normalmente en humanos) durante un periodo de tiempo prolongado (Ishibashi y col. 2001; Sanders y col. 2010).

Globalmente, aunque las distintas pruebas *in vitro*, *ex vivo* y en modelos animales pueden proporcionar información útil durante el proceso de selección de cepas, los únicos datos que permiten evaluar la seguridad de un probiótico de una forma directa son los que se obtienen en el curso de ensayos clínicos de fase 1, 2 y 3, correctamente diseñados y dirigidos específicamente a la población diana (Rodríguez, 2015).

4.3.5. Estudios en humanos

En general, se recomienda que la primera vez que un probiótico se vaya a usar en humanos, el principal criterio a analizar sea la seguridad. Esto es especialmente relevante cuando se trata de probióticos para alimentación infantil. Según ESPGHAN hay datos suficientes para soportar la seguridad de los probióticos en niños de 6 meses en adelante, pero sin embargo los datos sobre su uso en neonatos son mucho más escasos. La evaluación de la seguridad de diferentes cepas probióticas en recién nacidos ha puesto de manifiesto que la curva de crecimiento de los niños fue favorable y no existió incidencia de reacciones adversas, resultando todas las cepas analizadas seguras para su uso en neonatos (Gil-Campos y col. 2012; AlFaleh y col. 2013; Szajewska y col. 2013; Narbona López 2014; Cekola y col. 2015).

4.4 Funcionalidad.

Desde el punto de vista funcional, los criterios de selección de los probióticos suelen incluir, por una parte, una serie de prerrequisitos para que la cepa pueda alcanzar su lugar de acción a una concentración y, por otra, propiedades que pudieran asociarse a un efecto beneficioso (Maldonado Lozano y col. 2014c; Rodríguez, 2015) (Figuras 4-1 y 4.2).

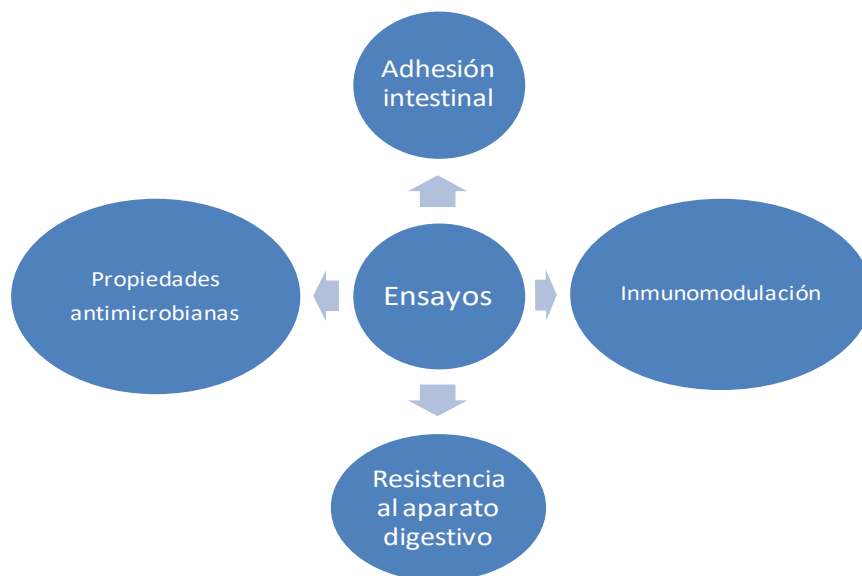


Figura 4-1. Probióticos: ensayos relacionados con la funcionalidad.

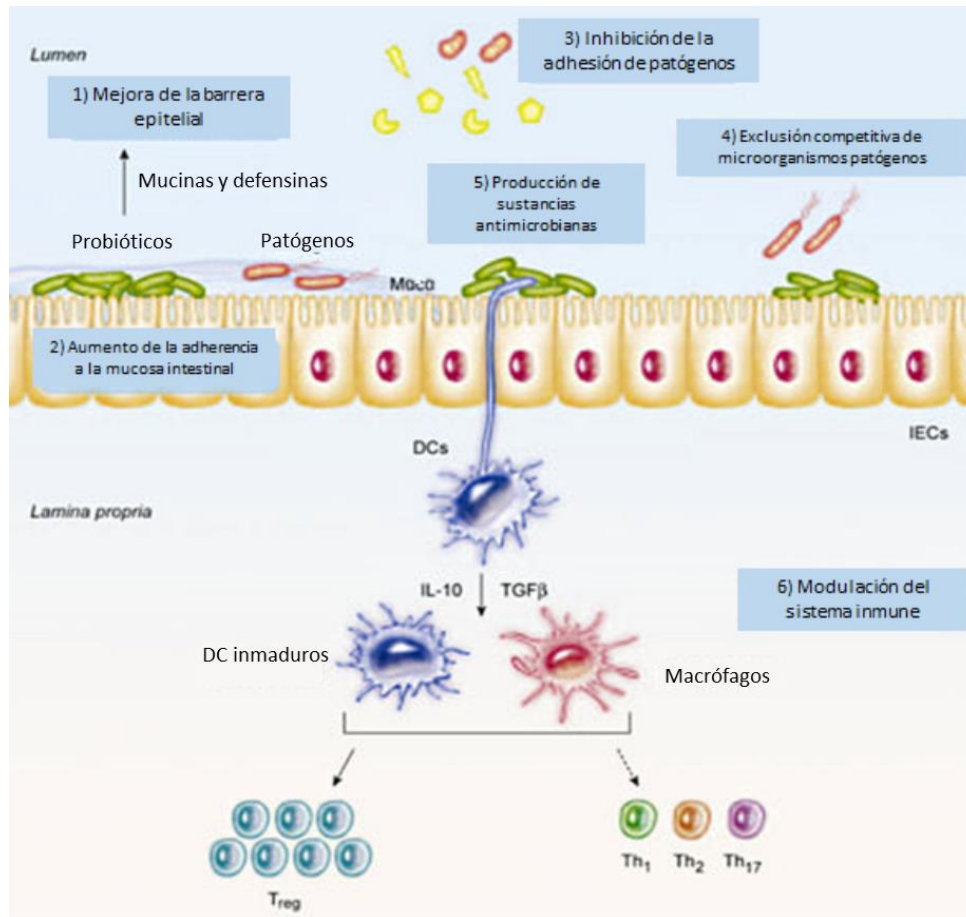


Figura 4-2. Probióticos: principales mecanismos de acción (Tomado de Bermúdez-Brito y col, 2012).

4.4.1. Resistencia durante el tránsito por el aparato digestivo

La resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares es una característica esencial a la hora de elegir un probiótico, ya que son condiciones de estrés que constituyen una barrera limitante para su supervivencia en el ecosistema. Con el fin de demostrar si es capaz de aguantar estas condiciones, se realizan estudios *in vitro* que simulan las condiciones de acidez producidas por las secreciones gastrointestinales en individuos sanos (Charteris y col. 1998; Dunne y col. 2001; Fernández y col. 2003; Martins y col. 2009), o el uso de modelos que simulan procesos *in vivo*, como es el empleado y desarrollado por el TNO (*Netherlands Organisation for Applied Scientific Research*) (Marteu y col. 1997).

4.4.2. Adhesión y colonización intestinal

Este es un criterio fundamental ya que para la correcta acción de los probióticos es indispensable que pasen un periodo de tiempo dentro del tubo digestivo. Por lo tanto, la adherencia al mucus y a las células epiteliales se consideran propiedades que los probióticos deben poseer para ejercer efectos inmunomoduladores (Martins y col. 2009; Kotzamanidis y col. 2010) y de excluir la adhesión de patógenos (Bernet y col. 1994). Para probar esta capacidad de adhesión y colonización en el intestino, se utilizan estudios *in vitro*. Para ello se utilizan líneas celulares derivadas del adenocarcinoma de colon, como la línea Caco 2 y la HT29. Existen muchos trabajos en los que se utilizan ambas líneas celulares para demostrar la capacidad de adhesión de los probióticos a estas células una vez diferenciadas y tras un tiempo en cultivo (Bernet y col. 1994; Dunne y col. 2001; Preising y col. 2010).

4.4.3. Inmunomodulación

Los procesos de disbiosis de la microbiota endógena alteran las respuestas inmunitarias y contribuyen a la aparición de enfermedades infecciosas, inflamatorias y autoinmunes. La interacción realizada entre los probióticos y las células que forman el epitelio intestinal es fundamental a la hora de producir un efecto en el sistema inmune y de modularlo, induciendo un perfil de citoquinas determinado. (Maldonado Lozano J y col. 2014c).

En este sentido, se ha evaluado el efecto de diversas cepas bacterianas sobre los distintos componentes tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa o adquirida. Estos estudios abordan la proliferación y expresión génica de diversas poblaciones de células del sistema inmunitario y la producción de un amplio espectro de inmunoglobulinas, citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento por parte de las mismas (Hardy y col. 2013).

Además de ejercer una acción por medio del contacto con los enterocitos, numerosos estudios evidencian la capacidad de los probióticos para modular tanto la respuesta inmunitaria innata como la adquirida, por medio de la activación de las células NK en el caso de la inmunidad innata (Olivares M y col. 2007) y de los linfocitos T en el caso de la inmunidad adquirida (Pérez-Cano y col. 2010), siendo estos casos sólo unos ejemplos (Figura 4-3). Mediante experimentación animal se ha comprobado que los probióticos producen una reducción de la incidencia y de los síntomas de alergia alimentaria y una

reducción de la respuesta inflamatoria en modelos de enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras acciones (Isolauri y col. 2012; Jonkers y col. 2012).

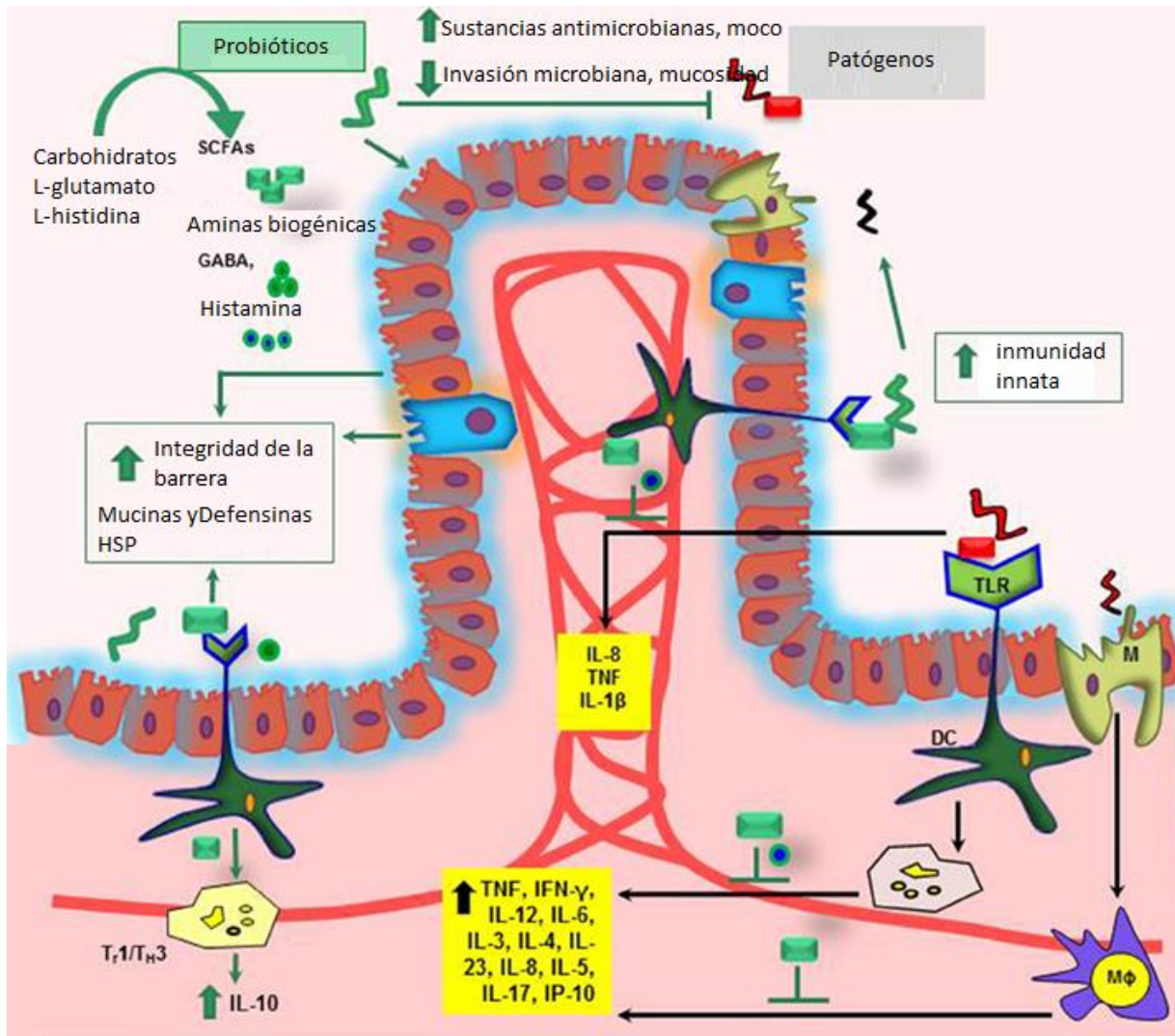


Figura 4-3. Mecanismo de probiosis en el tracto gastrointestinal (Tomado de Ganesh BP, 2015).

Las células dendríticas del intestino interactúan con las bacterias presentes en la luz intestinal e intervienen en la respuesta de tolerancia o respuesta inmune frente a las mismas, mediante la regulación de la diferenciación de las células T en Th1, Th2, Th17 o células Treg. Diversos tipos de células Treg, tales como Th3, T_R1, CD4⁺CD25⁺ regulador, CD8⁺ supresor y las células T_γδ, pueden ser influenciadas por los probióticos. Ya que estas células reguladoras desempeñan un papel significativo en la respuesta inmune, los probióticos pueden ejercer sus efectos antiinflamatorios a través de su acción

moduladora sobre estas células (Thomas y col. 2010; Bermudez-Brito y col. 2012). Por otro lado, diversos estudios han demostrado que los probióticos pueden estimular la producción de IgA por las células plasmáticas, si bien esta capacidad de estímulo es dependiente de la cepa.

Experimentos *in vitro* han demostrado cómo distintas cepas de probióticos modulan la respuesta inmune induciendo a la expresión de un tipo u otro de citoquinas, habiéndose comprobado, por ejemplo, como el *Lactobacillus sakei* induce a una mayor expresión de IL-1 β , IL-8 y TNF α , mientras que el *Lactobacillus johnsonii* estimula la producción de TGF β en células Caco 2 (Haller D y col. 2000). En otros estudios, se ha analizado el carácter de tipo antiinflamatorio que puede poseer una cepa de probiótico por la reducción de la secreción de IL-8 en células Caco 2 o T 84 (Preising J y col. 2010). El perfil de citoquinas y de otros mediadores inducido en los enterocitos, actuará sobre las células del sistema inmune diferenciándolas hacia un tipo de respuesta determinada (Figura 4-4).

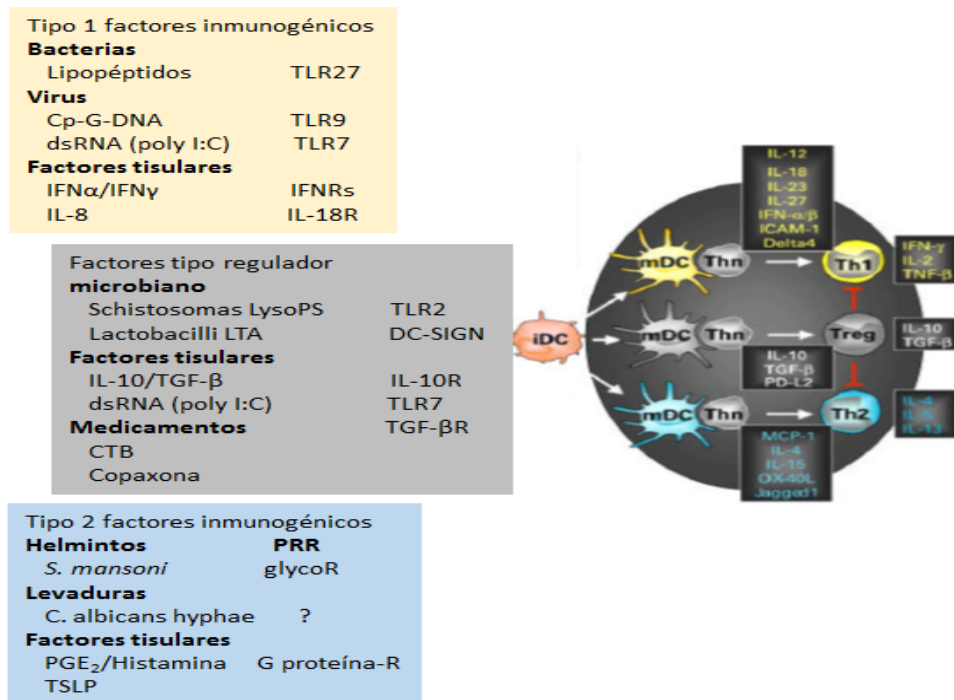


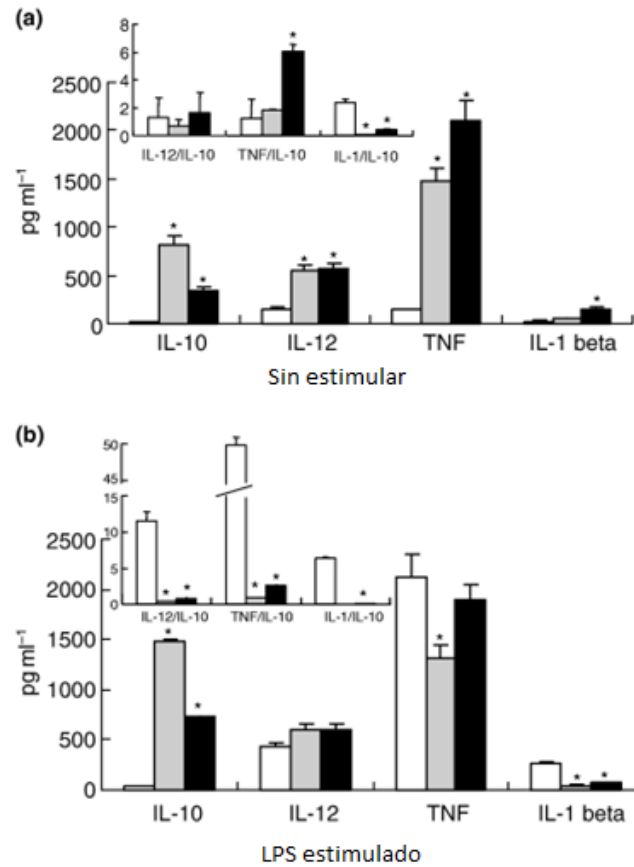
Figura 4-4. Tipos de respuesta inmune frente a distintos estímulos.

Estudios *in vitro* realizados con distintos tipos de células como macrófagos, linfocitos, células dendríticas, células NK, linfocitos T o con células de Kúpffer (Martins y col. 2009; Dong y col. 2010; Pérez-Cano y col. 2010; Verbeek y col. 2010), han demostrado que la interacción entre estos tipos celulares y las bacterias probióticas u otro tipo de microorganismos, se produce por medio de receptores específicos, los TLR. A partir de esta interacción y dependiendo del estímulo, se desencadenará una respuesta de tipo antiinflamatoria, proinflamatoria o reguladora (Figura 4-4). Estos estudios han demostrado que la capacidad inmunomoduladora de algunas cepas probióticas depende del estado de activación de dichas células.

Se ha observado que en ausencia de estímulos, los probióticos pueden actuar como agentes inmunoestimulantes produciendo un aumento de la expresión de citoquinas Th1 y mediadores inflamatorios, como lo son el TNF α , IL-12 e IL-2. Sin embargo, la misma cepa es capaz de producir un efecto contrario en el caso de que las células se encuentren previamente activadas, reduciendo la expresión de las citoquinas inducidas por agentes bacterianos. Este efecto probablemente sea debido a un aumento de la producción de IL-10, la cual es una citoquina de tipo regulador, cuya producción se ve aumentada gracias a la acción de ciertas cepas de probióticos (Figura 4-5) (Díaz-Roperó y col. 2007). Se ha comprobado que *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 es capaz de modular la respuesta del sistema inmune: sin estímulos da lugar a un aumento de la producción de citoquinas de tipo Th1, como lo son el TNF α , IL-12 e IL-2, mientras que en presencia de estímulo como puede ser la molécula de origen bacteriano LPS, el efecto de los lactobacilos es distinto, y da lugar a una reducción de la secreción de citoquinas de tipo Th1 (Díaz-Roperó y col. 2007).

Los efectos inmunomodulatorios de los probióticos también han sido reflejados en estudios con animales de experimentación, demostrándose un aumento de la respuesta del sistema inmune tanto de tipo innato como adquirido en ratones (Díaz-Roperó y col. 2006). Debido a esta actividad de tipo inmunoestimuladora, se da un efecto de tipo antiinfeccioso en modelos de infección por *Salmonella* en ratones (Olivares y col. 2006). En modelos de inflamación intestinal, el uso de un probiótico ha llevado consigo resultados positivos reduciendo el daño en el tejido intestinal, debido a la acción de tipo antiinflamatoria realizada por parte del tratamiento con un probiótico (Perán y col. 2007).

Los probióticos han demostrado modular la respuesta inmune en personas sanas, aumentando la respuesta de las células NK y el nivel de Ig A tras tres meses de consumo (Olivares y col. 2006; Parra y col. 2004).



La producción de citoquinas por macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM) se incubó con *Lactobacillus salivarius* CECT5713 (barras grises), *Lactobacillus fermentum* CECT5716 (barras negras) o en ausencia de bacterias (barras blancas). (A) BMDM no estimulada; (B) LPS (10 ng ml⁻¹) estimuló BMDM. Los resultados se expresan como concentración de citoquina (pg ml⁻¹) ± SD. Para elucidar el tipo de respuesta inmunitaria, se representan la relación IL-12 / IL-10, TNF / IL-10 y IL-1β / IL-10 desencadenada. * Diferencia estadísticamente significativa (P < 0,01) con respecto al grupo control.

Figura 4-5. Diferencias en la inmunomodulación dependiendo de la existencia o no de estimulación (Tomado de Díaz-Ropero MP y col. 2007).

4.4.4. Neuromodulación

La neuromodulación es uno de los efectos más prometedores en el campo de los probióticos. El tracto intestinal contiene una gran y compleja red neural (el sistema nervioso entérico), cuya principal función es regular la fisiología del intestino y modular la comunicación entre éste y el SNC. Este sistema de comunicación se denomina “eje intestino-cerebro”, el cual modula la coordinación entre cerebro, intestino y sistemas endocrino e inmune implicados en mantener la función intestinal (ver capítulo 3).

Alteraciones en este eje se han asociado con alteraciones psiquiátricas y de la función intestinal (Bonaz y col. 2013; Galland, 2014; Mayer y col. 2015). Determinados probióticos son capaces de influir sobre esta conexión intestino-cerebro y, por tanto, sobre los procesos cognitivos y emocionales e incrementar la eficacia de los psicofármacos, además de los beneficios que puedan derivarse tanto sistémicos como intestinales (Critchfield y col. 2011; Saulnier y col. 2013; Mayer y col. 2014; Petra y col. 2015).

4.4.5. Propiedades antimicrobianas

Existen varios mecanismos por los cuales los probióticos desempeñan una función antimicrobiana. Entre ellos destaca la producción de sustancias antimicrobianas y la inhibición debida a fenómenos de competición por adhesión y por sustratos (Lara-Villoslada y col. 2007a; Rodríguez, 2015; Vandenplas y col. 2015).

El antagonismo microbiano de los probióticos depende, en parte, de su capacidad de adherencia a las mucosas. Es una característica clave para que una cepa pueda evitar el asentamiento de un patógeno potencial. En el proceso están implicados diversos componentes superficiales, incluyendo proteínas de unión al mucus, y algunas estructuras específicas, como los *pili* descritos en algunas cepas de *Lactobacillus rhamnosus*. Adicionalmente, la capacidad de autoagregación puede aumentar sustancialmente la capacidad de colonización en aquellos ecosistemas en los que los probióticos tienen un tiempo de residencia corto (Rodríguez, 2015).

La propiedad relevante de algunas cepas probióticas de coagregar con ciertos patógenos le permite impedir su acceso a las mucosas. El efecto antimicrobiano de la congregación es particularmente intenso cuando la misma cepa es capaz de producir sustancias antimicrobianas que inhiban al patógeno en cuestión (Boris y col. 1998). La integridad de las mucosas está influenciada por muchos factores, incluyendo su permeabilidad, la composición de las mucinas, el estrés oxidativo y el recambio de las células de la mucosa. Diversos estudios han demostrado la capacidad de algunos probióticos para mantener o mejorar la función de barrera intestinal mediante la modificación de la expresión de los genes que codifican proteínas de las zonas de oclusión, la modificación de la composición de monosacáridos de las mucinas, el aumento del grosor de la capa de mucus, la inhibición de los procesos de apoptosis y/o la promoción de la diferenciación celular y de actividades citoprotectoras, incluyendo la reducción del estrés oxidativo (Howarth y col. 2013)

El efecto protector de los probióticos viene también determinado por la generación de compuestos antimicrobianos (Rodríguez, 2015). El más universal es el ácido (láctico, acético, propiónico y/o butírico) que resulta del metabolismo fermentativo de los azúcares, dado que la mayoría de los organismos probióticos son anaerobios aerotolerantes o estrictos (De Keersmaecker SC y col. 2006). La generación de agua oxigenada es un carácter muy demandado en los candidatos a probióticos vaginales, porque juega un papel capital en la protección de dicha cavidad. También juega un papel la producción de bacteriocinas (nisina, pediocina y plantaricinas, entre otras) producidas por los probióticos, que son péptidos que producen poros en la membrana de las bacterias susceptibles o inducen su lisis, siendo, por tanto, bactericidas. El modo de acción de cada una de ellas es muy distinto.

Se ha comprobado como los sobrenadantes de cultivos de probióticos pertenecientes a *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 inhibieron el crecimiento de *Salmonella entérica* 1344, viéndose una clara reducción del crecimiento del patógeno en condiciones de anaerobiosis (Marianelli C y col. 2010). En un estudio *in vitro* realizado con 4 cepas aisladas de leche materna se demostró la capacidad de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella cholerasuis*, *Escherichia coli* y *Clostridium* así como de interferir en la adhesión de patógenos intestinales (Olivares M y col. 2006).

4.4.6 Aspectos tecnológicos

Los aspectos tecnológicos son muy importantes en la selección de probióticos para su posterior comercialización. Inicialmente, las investigaciones sobre probióticos suelen hacerse en el laboratorio, donde los volúmenes de los cultivos se miden en mililitros o litros mientras que en escala industrial se suelen medir en metros cúbicos. El hecho de que una cepa bacteriana crezca bien en condiciones de laboratorio (pequeños volúmenes, medios de cultivo complejos...) no significa, ni mucho menos, que vaya a suceder lo mismo en condiciones industriales. Por lo tanto, se deben tener en cuenta todas aquellas características de los probióticos que puedan influir en su producción industrial, ya que hay que asegurar la viabilidad de las cepas en número suficiente y el mantenimiento de sus propiedades funcionales durante el proceso productivo, el almacenamiento y la distribución de las cepas y/o alimentos con probióticos (Sanders y col. 1999; Shah, 2000).

En este sentido, las empresas que comercializan o desean comercializar probióticos se enfrentan a dos retos tecnológicos importantes: (1) la necesidad de obtener una biomasa bacteriana muy elevada

de forma económicamente rentable y (2) la necesidad de que la concentración de bacterias viables necesaria para ejercer el efecto beneficioso se mantenga hasta el final de la vida útil del producto (Rodríguez, 2015). Ambos aspectos están relacionados con las características fisiológicas de cada cepa, por lo que las condiciones deben establecerse caso a caso. Además, la viabilidad también depende del formato en el que se vayan a administrar las bacterias ya que, por ejemplo, la vida útil de los productos lácteos probióticos refrigerados es notablemente más corta que la de los productos liofilizados que se venden con una presentación medicamentosa (cápsula, polvo...). En cualquier caso, resulta imprescindible la aplicación de los principios del sistema APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos) y de buenas prácticas de fabricación para garantizar que los preparados probióticos lleguen al consumidor con la máxima calidad posible. Cuando una empresa introduce un probiótico en el mercado, debería asegurar que está bien etiquetado. En este sentido, el comité de expertos de la FAO/WHO (2002) recomendó que se recoja la siguiente información en la etiqueta de cualquier producto que contenga probióticos: a) género, especie y cepa; b) dosis mínima de microorganismos viables al final de la vida útil; c) cantidad necesaria de producto que se debe consumir para conseguir la dosis efectiva; d) efecto(s) beneficioso(s); e) condiciones de almacenamiento, y f) forma de contacto con el servicio de atención al cliente.

4.4. Aplicaciones de los probióticos.

Se han descrito aspectos beneficiosos de los probióticos en el tratamiento y prevención de distintas patologías (Tabla 4-4), algunas de las cuales están ya muy sustentadas por numerosos estudios clínicos y otras requieren de más estudios que corroboren los resultados obtenidos hasta el momento (NASPGHAN, 2006; Thomas y col. 2010; Wallace y col. 2011).

Existen muchos estudios sobre el uso de probióticos para la prevención y tratamiento de la diarrea infecciosa y la diarrea asociada a antibióticos, principalmente en niños. La utilidad en el tratamiento de la diarrea aguda infecciosa está bien documentada, especialmente en la diarrea de origen viral (Wolvers y col. 2010; Guarino y col. 2014; Szajewska H y col. 2014; Guarino y col. 2015; Vandenplas y col. 2015; Urbańska y col. 2016). La guía europea para el tratamiento de la diarrea aguda concluyó que ciertas cepas probióticas pueden ser usadas como adyuvante, junto con la terapia de rehidratación, en el tratamiento de niños con gastroenteritis aguda, pero también deja claro que debido

a la gran profusión de lactobacilos existentes y que no todos ellos funcionan igual para avalar una eficacia, es indispensable disponer de amplia documentación científica del producto.

Tabla 4-4. Aplicaciones de los probióticos en patologías médicas.

| Aplicaciones clínicas en el presente |
|---|
| Intolerancia a la lactosa |
| Gastroenteritis |
| Aguda |
| Asociada a antibióticos |
| Gastroenteritis asociada a <i>Clostridium difficile</i> |
| Diarrea del viajero |
| Reacciones alérgicas |
| Infecciones respiratorias en niños y en adultos |
| Caries |
| Enfermedad inflamatoria intestinal |
| Enfermedad de Crohn |
| Colitis ulcerosa |
| Otras patologías intestinales |
| Colon irritable |
| Enterocolitis necrotizante |
| Tratamiento en infecciones por <i>Helicobacter pylori</i> |
| Posibles aplicaciones clínicas en el futuro |
| Artritis reumatoide |
| Cancer |
| Enfermedades hepáticas inducidas por ethanol |
| Diabetes |

Entre el 11 y el 40% de los niños tratados con antibiótico sufren de diarrea asociada al tratamiento (Turck y col. 2003). Existen evidencias clínicas que demuestran una eficacia en la prevención y tratamiento de esta patología, viéndose una reducción de la sintomatología diarreica tras el consumo de probióticos, tanto en niños como en adultos (Goldenberg y col. 2015; Szajewska H y col. 2016). Una de los patógenos oportunistas que se asocia a la diarrea por tratamiento antibiótico es *Clostridium difficile*, productor de toxinas y agente etiológico de la colitis pseudomembranosa (Rodríguez y col. 2015). Estudios realizados en estos casos muestran que los probióticos poseen la capacidad de restaurar el balance microbiano y de esta forma bloquear la proliferación del *C. difficile* actuando tanto a nivel preventivo como de tratamiento (McFarland, 2006; Johnston y col. 2012; Goldenberg y col. 2013).

También se ha observado como algunas cepas de probióticos pueden ejercer un efecto preventivo en la diarrea del viajero (Mc Farland, 2007; Islam, 2016), si bien la heterogeneidad en el diseño de los estudios tanto a nivel de cepa, dosis y duración del tratamiento, hace que sean necesarios más estudios que evidencien el efecto preventivo de los probióticos frente a este tipo de diarrea (Wolvers y col. 2010).

La enterocolitis necrotizante es la patología digestiva adquirida más frecuente y grave en el periodo neonatal, que ocasiona una importante morbi-mortalidad. Según los últimos metaanálisis, el tratamiento profiláctico con probióticos en el recién nacido prematuro disminuye de manera significativa el riesgo de padecer una enterocolitis necrotizante grave. Dicho tratamiento también ha demostrado una disminución de la mortalidad, de los días de hospitalización y de los días tras los que se alcanza la nutrición enteral exclusiva (AlFaleh y col. 2014; Olsen y col. 2016). Por ello, el Grupo de Nutrición y Metabolismo de la Sociedad Española de Neonatología indica que en situaciones con alta incidencia local de enterocolitis, la suplementación con probióticos puede ser recomendada en los recién nacidos de muy bajo peso, ya que se asocia con una disminución del riesgo de enterocolitis y de muerte en los que presentan un peso >1.000 g (Narbona López y col. 2014). Sin embargo, este efecto beneficioso no se ha observado en los recién nacidos con un peso <1.000 g (Warner y col. 2016).

En cuanto a los cólicos del lactante, existe escasa evidencia que avale el uso de probióticos. Existen datos de que el uso de *Lactobacillus reuteri* mejora las crisis de llanto y que el tratamiento es efectivo, pero sólo después de 2-3 semanas de tratamiento, parejo a la evolución natural de este trastorno (Urbanska y col. 2014; Chau y col. 2015; Xu y col. 2015). Sin embargo, en otros estudios solo se encontró mejoría en los lactantes que tomaban leche materna (Anabrees y col. 2013; Sung y col. 2013), lo que limitaría su utilidad terapéutica, e incluso que la administración de *Lactobacillus reuteri* no tiene efectos beneficiosos sobre los lactantes con cólico, tanto si toman pecho como si toman fórmula (Sung y col. 2014). Otros bacilos y bifidobacterias también parecen tener algún efecto beneficioso en la mejoría de los síntomas del cólico del lactante (Aloisio y col. 2012; Pärty y col. 2015).

Distintas evidencias sugieren un importante papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la inflamación crónica de la mucosa intestinal en la enfermedad inflamatoria intestinal, habiéndose identificado una disbiosis intestinal en estos pacientes (Matsuoka y col. 2015). No existen evidencias claras de la utilidad de los probióticos en el tratamiento de estas patologías, ya que existen estudios que

no encuentran ninguna efectividad (Rahimi y col. 2008), y otros en los que si se observaron beneficios (Hart y col. 2003; Hedin y col. 2007) si bien dicha eficacia de los probióticos se demostró en la pouchitis y la colitis ulcerosa, pero no en la enfermedad de Crohn. VSL # 3 es una preparación liofilizada que contiene ocho bacterias diferentes (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *B. breve*, *B. infantis* y *B. longum*) y se ha demostrado su eficacia de en la prevención de la recurrencia en pacientes con pouchitis crónica recidivante y en la inducción de la remisión y su mantenimiento en pacientes con colitis ulcerosa activa (Miele y col. 2009; Tursi y col. 2010; Shen y col. 2014). Otras bacterias como *Nissle 1917* (Kruis y col. 2004) y *Lactobacillus GG* (Zocco y col. 2006) también han demostrado eficacia en el mantenimiento de la remisión en la colitis ulcerosa, pero no en pacientes con enfermedad de Crohn (Fedorak y col. 2012; Scaldaferri y col. 2013).

En relación con el síndrome de intestino irritable, un metaanálisis realizado por McFarland y Dublin (2008) mostró que los probióticos producían una mejoría de la sintomatología clínica comparados con placebo. Otros estudios parecen confirmar esta mejoría de los síntomas al encontrar un efecto beneficioso sobre el dolor y la flatulencia (*Lactobacillus GG* y VSL # 3) pero no sobre la distensión abdominal ni sobre la frecuencia de las crisis de dolor, e incluso ningún efecto (Whelan y col. 2011; Simrén y col. 2013; Korterink y col. 2014; Huertas-Ceballos y col. 2014; Vandenplas y col. 2015), por lo que no existe una evidencia clara para su utilización en este cuadro clínico y no se pueden recomendar cepas específicas para el tratamiento de rutina (Islam, 2016).

Las infecciones debidas a *H. pylori* son una de las principales causas de gastritis crónicas y úlceras gástricas. Algunos probióticos han demostrado ser eficaces al asociarlos al tratamiento antibiótico mejorando las tasas de erradicación, lo que no ocurre si se administra solamente el probiótico (Lionetti y col. 2010; Wang y col. 2013; Zheng y col. 2013; Patel y col. 2014).

Existen estudios que demuestran un efecto beneficioso tras el consumo de probióticos en yogures, viéndose una mayor digestión de la lactosa (He y col. 2008; Ojetti y col. 2010). En una guía publicada sobre el impacto de los probióticos sobre la función digestiva, se concluye que si bien hay evidencias de efectividad de los probióticos sobre la intolerancia a la lactosa, ésta es dependiente de la cepa (Rabot y col. 2010). Si bien hay estudios que demuestran una mejor digestión de lactosa y menor excreción de hidrógeno en el aire espirado en pacientes que consumen lácteos fermentados, en la

actualidad, no existe evidencia suficiente para recomendar el uso de probióticos en el manejo sistemático de la intolerancia a la lactosa (Álvarez-Calatayud y col. 2013).

El potencial de determinadas cepas bacterianas para suprimir la respuesta mediada por Th2, favorecer la respuesta inmune Th1 y Th3 y aumentar las respuestas inmunes mediadas por Treg en los pacientes atópicos, puede crear condiciones óptimas para reconducir la memoria inmune y reducir el riesgo de enfermedad atópica. (Rather y col. 2016). Revisiones sobre prevención de atopia y probióticos, han puesto de manifiesto que la administración de probióticos durante el embarazo y la lactancia a madres con antecedentes de atopia, reduce el riesgo de dermatitis atópica y sensibilización alérgica en el niño (Osborn y col. 2007; Frei y col. 2015). Sin embargo, este efecto no se observó cuando los probióticos se administraron sólo prenatalmente o sólo postnatalmente (Zhang y col. 2016). Por otro lado, existen estudios donde la utilización de probióticos no produjo una reducción en la incidencia de dermatitis atópica (Taylor y col. 2007; Kopp y col. 2008; Boyle y col. 2008; Allen y col. 2014). En definitiva, no existen datos consistentes para apoyar la eficacia de la administración de probióticos para la prevención de la dermatitis atópica. En lo que respecta al tratamiento de la dermatitis atópica, las pruebas que apoyan el uso de probióticos son muy limitadas y los resultados de los metaanálisis son inconsistentes (Boyle y col. 2008; Kim y col. 2014; Rather y col. 2016) y, por lo tanto, no se ha establecido definitivamente el papel de los probióticos en el tratamiento de la dermatitis atópica.

Durante los últimos años se han realizado numerosos estudios que han evaluado el papel de los probióticos en la alergia alimentaria, observándose que la administración oral de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* podría disminuir la tasa de alergias alimentarias (Álvarez-Calatayud y col. 2013; ZukieWicz-Sobczak y col. 2014). Una revisión reciente llega a la conclusión de que los probióticos administrados prenatalmente y postnatalmente podrían ser una forma factible de prevenir la hipersensibilidad alimentaria en niños pequeños (Zhang y col. 2016). Sin embargo, existen estudios donde no se han observado diferencias significativas entre el uso de probióticos y placebo (Di Mauro y col. 2016). No se han observado efectos beneficiosos sobre el asma, pero sí existen evidencias de tener cierta efectividad clínica e inmunológica en el tratamiento de la rinitis alérgica (Giovannini y col. 2007; Viagloftis y col. 2008; Zajac y col. 2015; Guvenc y col. 2016). En niños entre 4 y 12 años, el consumo de una leche fermentada que contenía dos cepas probióticas, *L. gasseri* CECT 5716 y *L. coryniformis* CECT 5711, se detectaron cambios significativos en parámetros bioquímicos e inmunológicos que podrían influir en una mejora del bienestar de los voluntarios (Martínez-Cañavate y col. 2009). No se han

demostrado efectos preventivos de los probióticos, para el asma y la rinitis alérgica (Azad y col. 2013; Di Mauro y col. 2016).

En relación con las infecciones respiratorias, se ha comprobado que los probióticos reducen el número de episodios de infección de vías respiratorias altas, la duración media de cada episodio, el consumo de antibióticos y el absentismo escolar o de la guardería, pero la calidad de la evidencia de estos estudios es baja o muy baja (Hojsak I y col. 2010; Hao Q y col. 2015; Wang Y y col. 2016).

5. PROBIÓTICOS EN FÓRMULAS LÁCTEAS PARA LACTANTES

La leche materna es el mejor alimento para los bebés durante sus fases de rápido desarrollo, puesto que no sólo aporta todos los nutrientes necesarios, sino que además contiene importantes factores funcionales implicados en el desarrollo y la maduración del sistema inmunitario neonatal, así como en la protección frente a infecciones. Entre estos factores se incluyen las bacterias comensales de la leche materna. La demostración de la existencia de bacterias en la leche materna y los efectos beneficiosos potencialmente ejercidos por éstas en el lactante (antimicrobiano, antiinflamatorio y/o modulador de la respuesta inmunitaria) ofrecen nuevas alternativas para la sustentación de las propuestas dirigidas a la inclusión de determinadas cepas probióticas en los preparados para la alimentación de los lactantes.

La microbiota presente en los niños alimentados con leche humana es más rica en ciertos géneros bacterianos que podrían ser responsables de algunos de sus beneficios. Estas bacterias pueden ejercer un papel clave en la reducción de las infecciones del lactante, tal y como se ha observado en relación con la hospitalización por neumonía, riesgo de muerte por diarrea e incidencia de otitis media, infección urinaria y meningitis (Lara-Villoslada y col. 2007a). Las bacterias con propiedades probióticas que son transferidas al niño a través de la leche materna, podrían estar contribuyendo a estos beneficios a través de sus efectos tanto a nivel de inhibición del crecimiento de patógenos, como por la capacidad de modificar la microbiota del tracto gastrointestinal, junto con las propiedades de tipo inmunomoduladoras que poseen. Con el objetivo de que los niños alimentados con preparados para lactantes adquieran una microbiota beneficiosa, similar a la de los niños alimentados con leche humana, en los últimos años se están incorporando a las fórmulas infantiles ingredientes que promuevan esta microbiota bien a través de la adición de componentes prebióticos como oligosacáridos, o bien añadiendo directamente cepas bacterianas probióticas.

5.1. ¿Está justificado suplementar los preparados lácteos para lactantes con probióticos?

En 2006, el Comité Científico para Alimentación de la Unión Europea consideró que la información disponible hasta ese momento sobre el efecto de los probióticos en la alimentación de los lactantes, era insuficiente (Ribas Malagrida y col. 2007). Respecto de las fórmulas de inicio aconsejaba realizar más estudios antes de incluir los probióticos como componentes de las mismas. Para las

fórmulas de continuación estimó que sí se disponía de experiencia en el mercado, por lo que no puso objeciones para continuar su uso, si bien indicó que el contenido real del probiótico en el momento del consumo de la fórmula debería ser de 10^6 a 10^8 UFC/ml de preparado, para así asegurar su eficacia.

En 2011, el Comité de Nutrición de la ESPGHAN (ESPGHAN Committee on Nutrition, 2011) publicó una revisión sistemática en relación con la seguridad y efectos sobre la salud de la ingesta de fórmulas lácteas suplementadas con probióticos. En esta revisión, en la que se incluyeron 20 publicaciones que cumplían los criterios de inclusión, se analizaron tanto fórmulas de inicio como de continuación, y se comprobó que existía una gran variedad en el tipo de probiótico utilizado, en las dosis y en el período de suplementación, por lo que era difícil obtener datos concluyentes. Y es que no todos los probióticos son iguales, ya que la acción es específica de cada cepa y los resultados obtenidos con una cepa no son extrapolables a otras cepas. El Comité de Nutrición de la ESPGHAN llegó a las siguientes conclusiones:

- Las fórmulas suplementadas con probióticos no producen efectos adversos y no alteran el crecimiento.
- En menores de 4 meses no se han constatado efectos clínicos consistentes con la ingesta de fórmulas de inicio suplementadas con probióticos.
- La administración de fórmulas de inicio o continuación suplementadas con probióticos puede tener efectos beneficiosos tales como menor riesgo de infecciones gastrointestinales, menor uso de antibióticos y menor frecuencia de cólico y/o irritabilidad.
- No existen datos sobre los efectos a largo plazo de la administración de fórmulas suplementadas con probióticos.
- Como conclusión final, el Comité no recomendaba el uso de fórmulas suplementadas con probióticos de forma rutinaria.

5.2. Seguridad

Las fórmulas suplementadas con probióticos no producen efectos adversos y no alteran el crecimiento (ESPGHAN Committee on Nutrition, 2011). Con posterioridad, una revisión sistemática ha llegado a la conclusión de que la suplementación de la fórmula infantil con *B. lactis* da como resultado un crecimiento similar al que se encuentra en los lactantes alimentados con fórmula sin suplemento, pero no se pudo llegar a una conclusión sobre el efecto de la suplementación con *Lactobacillus rhamnosus GG* debido a no disponer de suficientes datos (Szajewska y col. 2013). Recientemente se ha

comunicado que una fórmula infantil enriquecida con oligosacáridos de la leche de vaca y *B. lactis* no altera el crecimiento normal del niño, es bien tolerada y mejora los marcadores de salud intestinal (Radke y col. 2016).

Hay datos suficientes para soportar la seguridad de los probióticos en niños mayores de 6 meses, sin embargo los datos sobre su uso en neonatos y lactantes menores de 4 meses son mucho más escasos. Un estudio controlado y randomizado, llevado a cabo en lactantes menores de 6 meses que tomaron una fórmula suplementada con *L. fermentum*, concluyó que la fórmula fue bien tolerada y no hubo repercusión sobre el crecimiento durante el período de estudio (Gil-Campos y col. 2012). Recientemente se ha comunicado que los prematuros > 30 semanas de edad gestacional alimentados con una fórmula láctea suplementada con *Saccharomyces boulardi*, mejoran el crecimiento y la tolerancia alimentaria y no se detectaron efectos adversos (Xu y col. 2016).

5.3. Prevención y tratamiento de enfermedades del lactante

En menores de 4 meses no se han constatado efectos clínicos evidentes con la ingesta de fórmulas de inicio suplementadas con probióticos (ESPGHAN Committee on Nutrition, 2011). Aunque se observó menor administración de antibióticos, menor incidencia de diarrea y menor incidencia de cólico y/o irritabilidad, debido a la variedad en la metodología, el tipo específico de probiótico estudiado, la duración de la intervención y la dosis de probiótico usada, no era posible obtener datos concluyentes. En un estudio reciente (Gil-Campos y col. 2012) se ha observado una disminución significativa en el número de episodios de diarrea infecciosa en los lactantes que tomaron la fórmula suplementada, pero no hubo diferencias en otro tipo de procesos infecciosos o en el número total de infecciones padecidas durante el período de estudio.

No hay evidencias consistentes que sugieran que la suplementación de una fórmula de continuación con probióticos en lactantes mayores de 4 meses, esté asociada con un efecto beneficioso frente a la diarrea infecciosa (ESPGHAN Committee on Nutrition, 2011), aunque se ha comunicado una reducción de la duración de la diarrea y del número de episodios de diarrea relacionada con la toma de fórmula suplementada con *B. lactis* (Weizman y col. 2005), con *L. reuteri* (Weizman y col. 2005) y con *L. salivarius* (Maldonado y col. 2010b), y disminución del riesgo de padecer diarrea asociada a antibióticos al tomar fórmula suplementada con *B. lactis* y *S. thermophilus* (Corrêa y col. 2005) o de padecer gastroenteritis aguda cuando se suplementó la fórmula con *B. bifidum* y *S. thermophilus* (Saavedra y col.

1994). En un estudio reciente controlado, doble ciego y randomizado, llevado a cabo con fórmula suplementada con *L. fermentum* en lactantes desde los 6 a los 12 meses de edad (período de intervención 6 meses), se comprobó que existía un 46% menos de incidencia de gastroenteritis aguda en los lactantes que tomaron la fórmula suplementada (Maldonado y col. 2012).

La inclusión de probióticos en la alimentación de niños menores de 4 meses, no ha dado como resultado una reducción en la incidencia de cólico ni la frecuencia de las deposiciones en los estudios realizados utilizando los probióticos *B. lactis* o *L. reuteri* ATCC 55730 (Weizman y col. 2006), *B. longum* BL 999 o *L. rhamnosus* LPR (Chouraqui y col. 2008). En cambio, en un estudio que usó *Lactobacillus rhamnosus* GG, si se observó un aumento en la frecuencia de deposiciones pero sin existir una reducción en la incidencia de cólico (Vendt y col. 2006), reducción que si se apreció al suplementar la alimentación con los probióticos *B. lactis* y *S. thermophilus* (Saavedra y col. 2004). En niños mayores de 4 meses de edad se han dado similares resultados en cuanto a la consistencia de la materia fecal con la utilización de *Lactobacillus rhamnosus* GG (Vendt y col. 2006) y de *L. reuteri* ATCC 55730 y *B. lactis* (Weizman y col. 2006).

Mugambi y col. (2012) realizaron una revisión sistemática de trabajos controlados y randomizados, siguiendo la metodología Cochrane. Sólo encontraron 10 publicaciones que cumplieran los criterios de inclusión, y no encontraron efectos sobre diarrea infecciosa, cólico, llanto/irritabilidad, regurgitaciones o vómitos. Tampoco en la revisión del Comité de Nutrición de ESPGHAN (ESPGHAN Committee on Nutrition, 2011) se encontró efecto beneficioso alguno sobre el llanto o la irritabilidad. Un estudio publicado en 2010 y que no había sido incluido en la revisión de la ESPGHAN (Savino y col. 2010) mostró que la administración de *L. reuteri* DSM 17938 mejoró considerablemente los síntomas en los lactantes que sufrían de cólico. A pesar de que *L. reuteri* puede ser eficaz para el tratamiento de lactantes amamantados con cólico, no hay evidencia suficiente para apoyar el uso de probióticos de forma rutinaria para el tratamiento o para la prevención del cólico, especialmente en lactantes alimentados con fórmula (Sung y col. 2013).

Como ya se refirió en el capítulo de probióticos, el tratamiento profiláctico con probióticos en el recién nacido prematuro disminuye de manera significativa el riesgo de padecer una enterocolitis necrotizante grave, por lo que la suplementación con probióticos puede ser recomendada en los recién nacidos de muy bajo peso. En una reciente revisión sobre el efecto de distintos inmunonutrientes en la prevención de la enterocolitis necrotizante (Zhou y col. 2015), se llega a la conclusión de que existen

datos suficientes que avalan la utilización de los probióticos suplementados en las fórmulas lácteas para la prevención de la referida patología. Sin embargo, en un estudio multicéntrico en el que participaron 24 hospitales e incluyó a 1315 recién nacidos prematuros, alimentados con una fórmula hidrolizada con o sin suplementación del probiótico *Bifidobacterium breve* BBG-001, no se encontraron beneficios (Costeloe y cols, 2016).

En relación con el padecimiento de infecciones respiratorias, ninguna de las dos revisiones sistemáticas (ESPGHAN Committee on Nutrition, 2011; Mugambi y col. 2012) encontraron diferencias significativas ni en la duración de la enfermedad ni en el número de episodios. Estudios realizados con fórmula suplementada con *L. salivarius* (Maldonado y col. 2010), *L. fermentum* (Maldonado y col. 2012), *Bifidobacterium lactis Bb12* (Taipale y col. 2011) o con *Lactobacillus rhamnosus GG* y *Bifidobacterium lactis BB12* (Rautava y col 2009), han puesto de manifiesto una significativa reducción en el número de episodios de infecciones respiratorias de vías altas en los lactantes que tomaron dichas fórmulas. Además, en el estudio realizado con *L. fermentum* también se encontró una reducción significativa del 30% en el número total de infecciones. En cambio, en otros estudios en los que se empleó una fórmula láctea enriquecida con *B. lactis* (Weizman y col. 2005; Velaphi y col. 2008) o *L. reuteri* ATCC 55730 y *L. johnsonii La1* (Weizman y col. 2005; Brunser y col. 2006), no se encontró una reducción en la incidencia de infecciones respiratorias.

Aunque no existen datos suficientes que avalen un efecto beneficioso de los probióticos adicionados a las fórmulas sobre el menor padecimiento de enfermedades alérgicas (ESPGHAN Committee on Nutrition, 2011), si es cierto que varios metaanálisis han concluido que el uso de probióticos disminuye la incidencia en los lactantes de dermatitis atópica, asociada o no a IgE, pero no de otros tipos de alergia (Osborn y col. 2007; Lee y col. 2008; Tang y col. 2010; Pelucchi y col. 2012). Se ha demostrado que el tratamiento dietético con una fórmula altamente hidrolizada suplementada con el probiótico *Lactobacillus rhamnosus GG*, da como resultado una mayor tasa de adquisición de tolerancia en lactantes con alergia a las proteínas de la leche de vaca que en aquellos tratados solo con fórmula hidrolizada (Berni Canini y col. 2012; Berni Canini y col. 2013). Se ha descrito la existencia de un vínculo entre la disbiosis en la composición de la microbiota intestinal y la patogénesis de la alergia a proteínas de la leche de vaca (Thompson-Chagoyan y col., 2010; Tompson-Chagoyan y col. 2011) y que la administración de una fórmula hidrolizada con probióticos favorece la tolerancia, debido en parte al cambio en la estructura en la comunidad bacteriana del intestino del lactante (Berni Cananai, 2016).

Es posible que las alteraciones de la microbiota intestinal precedan al desarrollo del fenotipo alérgico, por lo que los probióticos podrían tener aplicaciones preventivas y terapéuticas (Isolauri y col. 2012). El potencial de determinadas cepas bacterianas para favorecer la respuesta inmune Th1 y Th3 frente a la respuesta Th2 en los pacientes atópicos, puede crear condiciones óptimas para reconducir la memoria inmune y reducir el riesgo de enfermedad atópica.

En cuanto a los efectos de los probióticos sobre la composición de la microbiota fecal, los resultados son conflictivos. Se ha descrito que existe un descenso en el recuento de bifidobacterias y enterobacterias con respecto al control (Langhendries y col. 1995; Brunser y col. 2006), y que no hay diferencias en lo que respecta a lactobacilos y bacteroides. Sin embargo, Maldonado y col (2010b) han comunicado un aumento del recuento en heces de bifidobacterias ($p=0.008$) y lactobacilos ($p=0.022$), sin diferencias en el recuento de otras cepas bacterianas, en los lactantes alimentados con fórmula láctea suplementada.

Conclusión

El Comité de Nutrición de ESPGHAN, tras el análisis de los datos, no recomienda el uso de fórmulas suplementadas con probióticos de forma rutinaria. Sin embargo, a la vista de los resultados comunicados con posterioridad a la referida revisión, es posible que la suplementación de las fórmulas lácteas con determinadas cepas bacterianas, pueda ser recomendable. La adición de probióticos a los preparados lácteos para la alimentación del lactante parece ser bien tolerada, sin efectos adversos y, gracias a los estudios realizados hasta el momento, se han podido recoger evidencias acerca de la efectividad de los probióticos presentes en estos preparados, aunque es necesaria la realización de más estudios para poder concretar y evaluar los determinados efectos de cada cepa. Mención especial tienen los estudios realizados con niños de edades ≤ 4 meses, ya que existe un número de estudios muy bajo y es difícil sacar conclusiones acerca de los efectos beneficiosos de los probióticos a estas edades (ESPGHAN Committee on Nutrition, 2011). No existen datos sobre los efectos a largo plazo de la administración de fórmulas suplementadas con probióticos.

6. LA MASTITIS DURANTE LA LACTANCIA.

La mastitis es una patología común entre las madres lactantes y que, con excesiva frecuencia, conduce a un abandono precoz e innecesario de la lactancia materna (Scott JA y col. 2008). Su incidencia está más frecuente en la segunda y tercera semanas posparto y la mayoría de los estudios indican que el 74- 95% de los casos ocurren en las primeras 12 semanas, pero puede producirse en cualquier momento de la lactancia (World Health Organization, 2000; Lawrence y col. 2007; Scott y col. 2008). La incidencia de esta enfermedad está alrededor del 10% y oscila, según diferentes estudios, entre el 3 y el 33% (Delgado y col. 2009a; Espínola-Docio y col. 2016). Esta variabilidad en los datos de incidencia es debida fundamentalmente a diferencias en los criterios de diagnóstico de la enfermedad. En España se estima en torno al 10%, aunque se carece de datos epidemiológicos. Posiblemente, esta cifra sea algo mayor en realidad, según indican diversas asociaciones de lactancia españolas. De hecho, los últimos estudios llevados a cabo en España muestran porcentajes de incidencia que superan el 20% (Fernández y col. 2016a; Hurtado y col. 2017).

6.1. Mastitis no infecciosa

En el momento en que no se vacía la leche del pecho su producción disminuye, llegando incluso a poder cesar. Sin embargo, este proceso tarda algunos días y puede no completarse hasta pasadas 2-3 semanas. Entre tanto, la leche acumulada puede originar una respuesta inflamatoria.

La leche normalmente contiene citoquinas, tanto inflamatorias como antiinflamatorias. Se cree que las *citoquinas antiinflamatorias* y otros factores protegen al niño, pero las *citoquinas inflamatorias*, tales como la IL-8, pueden ser más importantes para proteger al pecho de la infección. En mujeres afectas de mastitis se ha encontrado un aumento de los niveles de IL-8 en el pecho y es un signo evidente de que se está produciendo una respuesta inflamatoria (Willumsen y col. 2000). Como parte de la respuesta inflamatoria, los espacios intercelulares se abren permitiendo que sustancias del plasma pasen a la leche, particularmente inmunoproteínas y sodio. Al mismo tiempo, aumenta la presión de la leche en los conductos y alvéolos, pudiendo llegar a forzar que sustancias de la leche pasen al tejido circundante. Las citoquinas de la leche pueden inducir una respuesta inflamatoria en el tejido circundante y también es posible que otros componentes induzcan una reacción antigénica.

La inflamación es la responsable de los signos y síntomas de la mastitis, encontrando así parte del pecho dolorido, enrojecido, hinchado y endurecido. Normalmente sólo suele afectar a un pecho. La mujer a menudo tiene fiebre y se siente enferma, sin embargo se ha observado que entre un tercio y la mitad de las mujeres con mastitis sólo tienen signos locales (Amir y col. 1999).

La apertura de los espacios intercelulares produce cambios en la composición de la leche. Los niveles de sodio y cloro aumentan, y los niveles de lactosa y potasio disminuyen. El sabor de la leche cambia haciéndose más salada, siendo algo temporal con una duración alrededor de una semana. Esto ha sido descrito como *disfunción mamaria crónica unilateral* (Conner, 1979). Sin embargo, la afección es reversible y después del siguiente embarazo habitualmente el pecho afectado recobra su función normal (Prentice y col. 1984).

6.2. Mastitis infecciosa

La mastitis infecciosa se produce en los casos en que no se resuelve la estasis de la leche y se supera la protección proporcionada tanto por los factores inmunitarios de la leche, como por la respuesta inflamatoria. La leche humana fresca no es habitualmente un medio adecuado para el crecimiento bacteriano (Pittard y col. 1985) y para que ocurra la infección deben existir condiciones que impidan al tejido mamario destruir y eliminar bacterias. Podría esperarse que la dirección natural del flujo de leche a lo largo de los conductos, cuando se extrae eficazmente, eliminase cualquier microorganismo hacia el exterior del pecho, pero el ineficaz vaciamiento de la leche conduce a la acumulación de ésta, creando las condiciones favorables para el crecimiento bacteriano. Los signos y síntomas de la mastitis infecciosa son imposibles de distinguir de la mastitis no infecciosa. Habitualmente solo está afectado un pecho y parte de él se pone rojo, doloroso, hinchado y endurecido, y puede haber síntomas generales de fiebre y malestar.

Los recuentos celulares y de colonias bacterianas son útiles para distinguir la mastitis infecciosa de la no infecciosa. Los cultivos de la leche materna pueden ayudar a determinar el microorganismo infectante y su sensibilidad antibiótica (Matheson y col. 1988). Si no es posible hacer un cultivo de forma rutinaria, puede hacerse selectivamente:

- para casos adquiridos en el hospital, casos graves o inusuales
- si no hay respuesta a los antibióticos en los dos primeros días

- si hay mastitis recurrente, que puede ser debida a un retraso en el tratamiento o a un tratamiento inadecuado de la afección inicial o a una mala técnica de lactancia no corregida (Inch y col. 1995).

El pecho que está lactando, como cualquier otro tejido infectado, focaliza la infección mediante la formación de una barrera de tejido de granulación alrededor de ella. Esta se convierte en la cápsula del absceso, el cual se llena de pus (Rench y col. 1989). La mayoría de los *abscesos mamarios* tienen su origen en la complicación de una mastitis infecciosa debido a un tratamiento tardío o inadecuado o a las características de la cepa bacteriana implicada, y la mayor parte se suele localizar en el borde superior de la areola mamaria (Delgado y col. 2009a). La incidencia de esta complicación en las mujeres con mastitis se sitúa entre el 3 y el 11%. Hay una tumoración intensamente dolorosa, con enrojecimiento, calor y edema de la piel que lo recubre. En los casos desatendidos la tumoración puede ser fluctuante, con decoloración y necrosis de la piel, pudiendo incluso acompañarse de fiebre en algunos casos. Para confirmar el diagnóstico puede aspirarse pus mediante una jeringuilla con aguja gruesa, debiéndose realizar el diagnóstico diferencial del absceso mamario con el galactocele, el fibroadenoma y el carcinoma.

Las mastitis infecciosas se clasifican en distintos subgrupos en función de la presencia de manifestaciones clínicas. Dentro del grupo de las mastitis clínicas, las cuales muestran síntomas clínicos de inflamación que pueden ir o no acompañadas de síntomas sistémicos, se distingue entre las mastitis agudas y subagudas.

6.3. Mastitis agudas, subagudas y subclínicas

La mastitis consiste en la inflamación de uno o varios lóbulos de la glándula mamaria, acompañada o no de infección (Amir, 2014). La definición clínica habitual de **mastitis aguda** es una zona tensa, caliente, hinchada y en forma de cuña asociada con una temperatura de 38,5 °C o mayor, escalofríos, dolor de tipo gripal y enfermedad sistémica (World Health Organization, 2000; Lawrence y col. 2007; Amir, 2014). Parece que hay un continuo desde la ingurgitación en la mastitis no infecciosa hasta la mastitis infecciosa y el absceso mamario (World Health Organization, 2000).

En gran parte de las mastitis clínicas sintomáticas el único síntoma es un dolor intenso que suele ir acompañado de síntomas locales, como grietas y/o zonas de induración, pero que no tienen ninguna afectación sistémica. Estos casos no son los más evidentes pero sí los más frecuentes y los que causan más destetes no deseados y por ello merecen prestarle una atención especial. Se trata de las **mastitis subagudas**, que se caracterizan por dolor local que se puede manifestar en forma de “pinchazos”, calambres o incluso producir una sensación de quemazón, pero sin llegar a presentar un enrojecimiento de la zona y sin afectación sistémica. Esto dificulta el diagnóstico y provoca que se trate de un problema infravalorado (Delgado y col. 2009a; Jiménez y col. 2009). Una afección relacionada es la aparición de la perla de leche en el pezón, retención de leche como consecuencia de la obturación total de algunos conductos galactóforos (conducto bloqueado) que empeora los síntomas locales y suele ser extremadamente dolorosa durante la succión. Se definen como estructuras características integradas por una matriz de calcio recubierta de bacterias.

La estasis de leche localizada que afecta a una parte del pecho tal como un lóbulo, se denomina a menudo *conducto bloqueado o ingurgitación mamaria focal* (Lauwers y col. 2000). Se supone que la afección es debida a una obstrucción sólida, pero incluso simplemente puede deberse a un vaciamiento ineficaz de la leche de esa parte del pecho. El signo clínico que lo pone de manifiesto es una masa dolorosa en un pecho, que suele venir acompañada por un enrojecimiento de la piel en esa zona. Sólo se ve afectada parte de un pecho. Habitualmente las mujeres se encuentran bien y no tienen fiebre. Algunas mujeres con un conducto bloqueado refieren la presencia de partículas de material en su leche extraída. En este caso puede que realmente haya obstrucción de un conducto lácteo. Los síntomas cesan rápidamente cuando se exprime el material de partículas sólidas liberándose la leche de la zona del pecho afectada. Se piensa que los gránulos que pueden encontrarse en la leche acumulada se forman a partir de una mezcla de caseína y otros materiales endurecidos por sales que contienen calcio; incluso se ha llegado a observar un material graso o filamentoso, a veces marrón o verdoso (Lauwers y col. 2000). El *galactocele* (Lawrence y col. 1999), que consiste en un quiste relleno de leche, se cree que se desarrolla a partir de un conducto bloqueado. Se presenta como un bultoma redondeado y terso en el pecho relleno de leche pura, que posteriormente alberga un material cremoso más denso conforme se absorbe el líquido. Su diagnóstico puede hacerse mediante aspiración o ecografía.

La **mastitis subclínica** se caracteriza por una falsa sensación de poca producción de leche. En la gran mayoría de los casos, ni la producción de leche está comprometida ni la composición nutricional es

inadecuada, sino que la formación de biopelículas en el interior de los conductos galactóforos impide su correcta secreción (Delgado y col. 2009a; Jiménez y col. 2009). Se diagnostica a partir del hallazgo de una relación sodio-potasio aumentada en la leche y un aumento de la concentración de IL-8, cuando no hay mastitis clínica. Se piensa que el aumento de los niveles de sodio e IL-8 indica que está ocurriendo una respuesta inflamatoria, a pesar de la ausencia de signos clínicos.

En la práctica, coexisten diversos términos (algo confusos) relacionados con problemas de lactancia (ingurgitación, obstrucción, retención, grietas, sobreinfección de grietas, pezones doloridos, etc.), los cuales se consideran como factores de predisposición a una posible mastitis infecciosa. No obstante, puesto que los agentes bacterianos que participan en las mastitis durante la lactancia son capaces de provocar por sí mismos la obstrucción de conductos y/o grietas, se evidencia cada vez más que estas situaciones no significan una predisposición a un proceso infeccioso, sino que son manifestaciones de una mastitis infecciosa. La propia OMS acepta la conexión existente entre los términos ingurgitación mamaria y mastitis (World Health Organization, 2000).

6.4. Etiopatogenia

La mastitis es una auténtica disbiosis de la microbiota normal de la glándula mamaria en la que se puede observar un espectacular aumento de la concentración del agente causal y la disminución de otras especies presentes de manera fisiológica en la leche humana, como lactobacilos, lactococos o bifidobacterias (Fernández y col. 2016). Las bacterias encontradas con más frecuencia en la leche de mujeres sanas sin síntomas de mastitis son *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans* y estreptococo del grupo B (Espínola-Docio y col. 2016). Sin embargo, cuando alguno de estos grupos prolifera de forma excesiva altera el equilibrio de la microbiota en la glándula mamaria y desencadena la reacción inflamatoria característica de la patología. Como consecuencia de la proliferación del agente causal el recuento de bacterias totales en la leche humana se multiplica alcanzando órdenes de 10.000-100.000 bacteria/ml en contraste con la concentración bacteriana total en la leche fresca de una mujer sin mastitis que suele ser inferior a 2.000 bacterias/ml (figura 6-1).

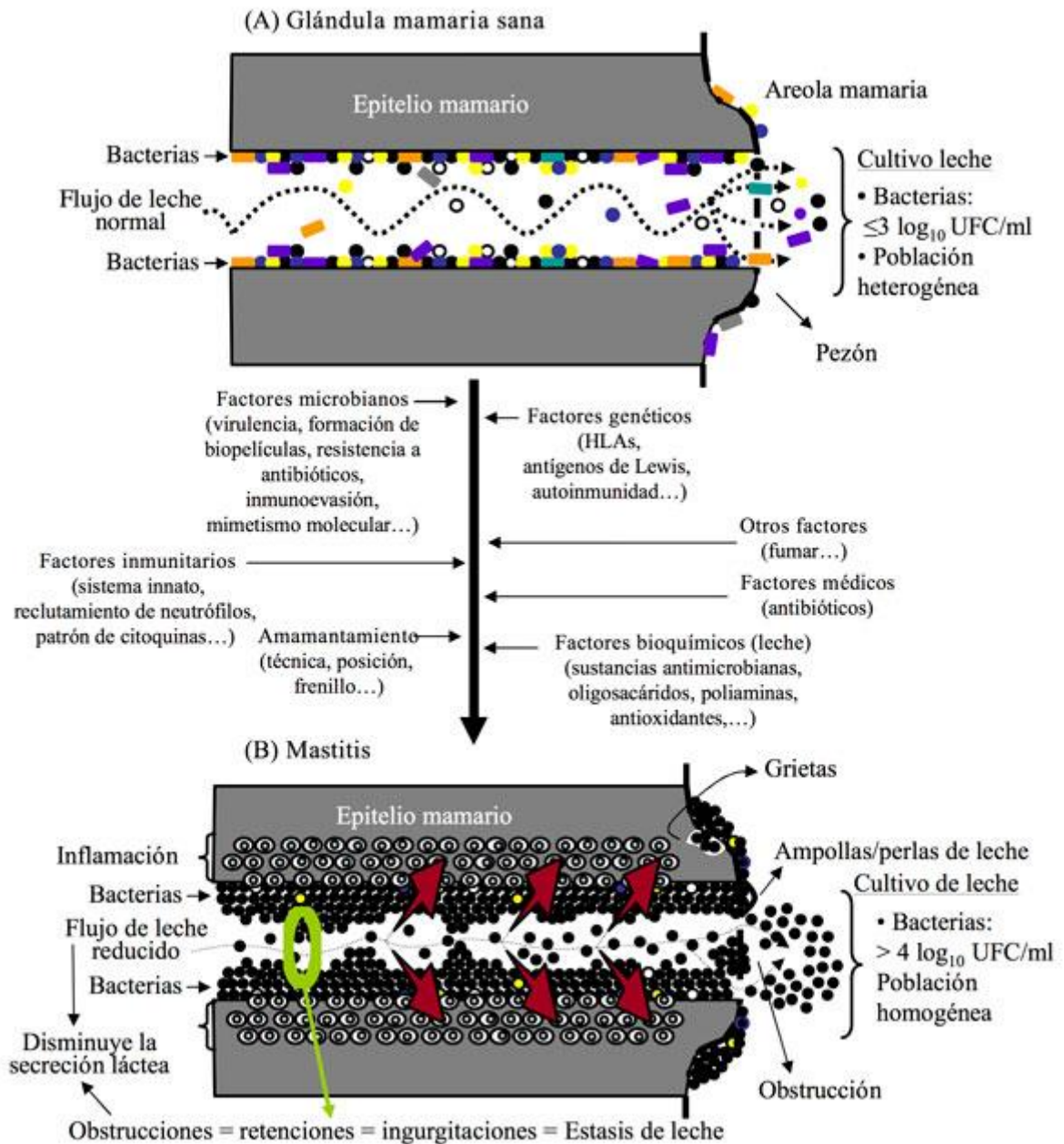


Figura 6-1. Disbiosis y etiopatogenia de la mastitis: Representación esquemática del epitelio y de los conductos mamarios en condiciones fisiológicas (A) y en situación de mastitis (B). Las flechas rojas indican el aumento de presión de la leche al pasar por una luz disminuida. Esta presión sobre una zona inflamada es la responsable de los típicos pinchazos. (Modificado de Fernández y col. 2014).

Staphylococcus aureus y *Staphylococcus aureus* resistente a metilina son los agentes bacterianos que con más frecuencia producen las **mastitis agudas**. Menos frecuentes como agentes etiológicos son *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp.,

Corynebacterium spp. y *Staphylococcus epidermidis*; el aislamiento de levaduras es muy raro (World Health Organization, 2000; Delgado y col. 2009a; Delgado y col. 2009b; Contreras y col. 2011; Amir, 2014; Jiménez y col. 2015).

Las bacterias se disponen en forma de películas biológicas (biopelículas o *biofilms*) en el epitelio de los acinos y los conductos galactóforos. Las biopelículas son aglomeraciones de microorganismos firmemente adheridos a una superficie, con una fisiología y una arquitectura muy características. El proceso de formación de las biopelículas comienza con la adhesión inicial de las células bacterinas a una superficie y su subsiguiente agregación en estructuras multicelulares (figura 6-2). Por consiguiente su desarrollo requiere fuerzas adhesivas, tanto para la colonización de la superficie como para el establecimiento de interacciones célula-célula (Carrera y col. 2012). Paralelamente, se necesitan fuerzas disruptivas para la formación de los canales que suministrarán los nutrientes a todas las células de la biopelícula; ambas fuerzas son responsables de la típica estructura tridimensional de una biopelícula madura. Las fuerzas disruptivas también están implicadas en el desprendimiento de ciertos grupos de células de la biopelícula, lo que puede conducir a una diseminación de la infección (O'Toole y col. 2000).

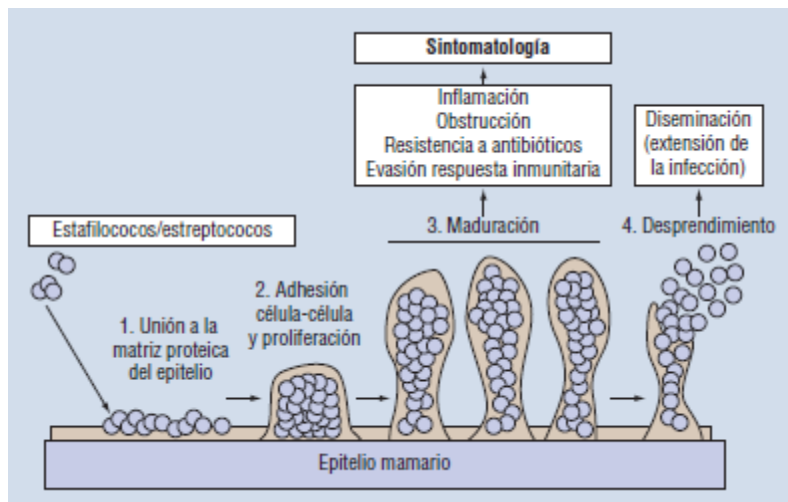


Figura 6-2. Representación esquemática del proceso de formación de una biopelícula o biofilm en el interior de los conductos galactóforos durante una mastitis (Tomado de Carrera y col. 2012).

Si la concentración bacteriana rebasa los límites biológicos produce la reducción de la luz de los conductos, provocando un sensible aumento en la presión que ejerce la leche sobre un epitelio que está

inflamado, y por tanto, conforme se acumula la leche en los conductos o cuando se produce la eyección de ésta, se siente un dolor intenso en forma de pinchazos (Delgado y col. 2009a)

Staphylococcus aureus se caracteriza además por la producción de toxinas que funcionan como superantígenos provocando una fuerte reacción inflamatoria responsable del intenso dolor, hinchazón, enrojecimiento, etc. Además, estas toxinas alcanzan fácilmente el torrente sanguíneo gracias a la alta vascularización del tejido mamario provocando una reacción sistémica similar a los síntomas que se producen ante una gripe (fiebre alta, cansancio, malestar, dolores musculares) (Fernández y col. 2014).

Por otro lado, las **mastitis subagudas** se deben a un sobrecrecimiento de ciertas especies de estafilococos coagulasa-negativos (*Staphylococcus epidermidis*), estreptococos de los grupos viridans/mitis (como *Streptococcus mitis* o *Streptococcus salivarius*) y algunas especies del género *Corynebacterium* (Carrera y col. 2012). Todas ellas, a diferencia del *Staphylococcus aureus*, son habituales en la glándula mamaria durante la lactancia pero se detectan en concentraciones muy moderadas en la leche (<1.000 colonias/ml). De hecho, a tales concentraciones juegan un papel beneficioso para el niño sin suponer ningún problema para la madre, formando una película fina en las paredes internas de los conductos, permitiendo un flujo completamente normal de leche. La presión de la leche al salir hace que algunas de estas bacterias se pongan en suspensión en este fluido. Son, precisamente, las bacterias que se transfieren de la madre al hijo y las que se pueden detectar en un cultivo (Paviour y col. 2002; Delgado y col. 2009b; Bercot y col. 2009). En ocasiones *S. epidermidis* puede llegar incluso a provocar abscesos (Moazzez y col. 2007). Estas especies bacterianas no producen las toxinas identificadas en el caso de *S.aureus* por lo que los síntomas de inflamación suelen ser menores que en el caso de las mastitis agudas y no suelen ir acompañadas de síntomas sistémicos. El hecho que no se suelen acompañar de enrojecimiento local ni de síntomas generales, es motivo de confusión frecuente a la hora de diagnosticarla y esto provoca que se trate de un problema tan infravalorado como infra diagnosticado (Delgado y col. 2009; Jiménez y col. 2009).

Tanto las mastitis agudas como las subagudas suelen ir acompañadas de zonas de induración dentro del pecho y, en ocasiones, de grietas (Delgado y col. 2009a; Jiménez y col. 2009). Aunque las grietas se han asociado generalmente a la postura durante la toma o a la anquiloglosia (aspectos que se deben revisar ante dicho problema), no hay que descartar la implicación de las propias bacterias causantes de las mastitis en su etiopatogenia; en este sentido, los microorganismos causantes de estas

mastitis son epidermolíticos por sí mismos cuando se encuentran en concentraciones elevadas en las glándulas de Montgomery.

Las mastitis subclínicas están causadas, por regla general, por las mismas especies que las subagudas, sin llegar a alcanzar concentraciones sumamente elevadas que generen dolor (Carrera y col. 2012). Se caracterizan por una reducción en la secreción de leche, elevadas concentraciones de bacterias en la leche y ausencia de signos evidentes de inflamación. En la leche se observa también un aumento en la relación sodio /potasio (Na + / K +) e incluso un aumento de IL-8 como consecuencia de una leve respuesta inflamatoria que no llega a evidenciarse clínicamente (Contreras y col. 2011). Sin embargo, en la práctica no se llevan a cabo análisis de leche cuando la madre acude a la consulta médica alegando sensación de falta de leche por lo que el problema no llega a diagnosticarse correctamente. .

6.5.- Factores predisponentes

El hecho de que una mujer padezca mastitis está relacionado con una serie de factores que pueden predisponer a su padecimiento, tales como aspectos relacionados con el historial médico de la madre (antecedentes de mastitis en lactancias previas o en la familia, infecciones, tratamiento con antibióticos, anemia) y del niño (hospitalización posparto, anquiloglosia, candidiasis oral), el embarazo, el parto, el posparto (cesárea, antibióticos, anestesia epidural, retraso en el contacto madre-hijo) y la lactancia (Fernández y col. 2016).

El uso de antibióticos durante el parto y el embarazo, conlleva cierto riesgo de disbiosis intestinal, vaginal y mamaria, y es un factor de riesgo relevante para el desarrollo de mastitis durante la lactancia (Delgado y col. 2009a, Mediano y cols, 2014; Soto y col. 2014). Durante el último tercio del embarazo la glándula mamaria se coloniza con bacterias procedentes del intestino materno (Fernández y col. 2013) y, entre ellas un pequeño porcentaje de estafilococos y estreptococos tienen genes de resistencia a antibióticos. Con el tratamiento antibiótico desaparecen las bacterias sensibles y se seleccionan las resistentes, que crecen sin competencia y alcanzan altas concentraciones, lo que conduce a una mastitis infecciosa (Delgado y col. 2008; Delgado y col. 2009a; Jiménez y col. 2009; Contreras y col. 2011).

Tras el nacimiento, las primeras horas son cruciales para que se establezca el vínculo madre-hijo y la lactancia se inicie y progrese adecuadamente. Cualquier interferencia (retraso en el contacto madre-

hijo, separación prolongada) podría suponer un factor predisponente para la mastitis (Mediano y col. 2014). Los factores relacionados con la lactancia se relacionan en la tabla 6-1. El riesgo de padecer mastitis se incrementa en cualquier circunstancia que interfiera en el establecimiento y en el desarrollo de la lactancia, ya que un vaciamiento incorrecto de la glándula mamaria podría intervenir en el desarrollo de la mastitis.

Tabla 6-1. Factores de riesgo de desarrollar mastitis relacionados con la lactancia

- Puesta al pecho no inmediata tras el nacimiento
- Problema en el primer agarre al pezón
- Subida de la leche después de 24 horas posparto
- Cantidad de leche
- Lactancia mixta
- Duración de la toma
- Edad del niño
- Chupete
- Pezoneras
- Biberón
- Pomadas en los pezones
- Bombas de extracción
- Grietas en los pezones
- Antibióticos orales durante la lactancia
- Antifúngicos tópicos durante la lactancia

Tomado de Fernández y col. 2016a.

Los dos factores más importantes para el desarrollo de mastitis son la *estasis o retención de la leche* y el *sobrecrecimiento bacteriano* y ésta puede venir acompañada o progresar hasta la infección, o no hacerlo (Espínola-Docio y col. 2016). Es bien conocido que la mastitis resulta del estancamiento de la leche dentro del pecho y que la extracción eficaz de la leche conforme se produce puede prevenir en gran parte este estado. La infección se producía a partir de la leche estancada la cual proporciona un medio de cultivo para el crecimiento bacteriano. Existen pruebas adicionales de la importancia de la estasis de la leche como el conteo de los leucocitos y de las bacterias en la leche obtenida de mamas

con signos clínicos de mastitis, gracias a los cuales se propone la siguiente clasificación: estasis de leche, inflamación no infecciosa (o mastitis no infecciosa) y mastitis infecciosa (tabla 6-2)..

| | Leucocitos < 10 ⁶ / ml de leche | Leucocitos > 10 ⁶ / ml de leche |
|---|--|--|
| Bacterias < 10 ³ / ml de leche | Estasis de leche | Mastitis no infecciosa |
| Bacterias > 10 ³ / ml de leche | | Mastitis infecciosa |

Tomado de Espínola-Docio y col. 2016.

En un estudio aleatorio controlado se halló que la *estasis de la leche* (<10⁶ leucocitos y <10³ bacterias) mejoró sólo con el amamantamiento continuado; la *mastitis no infecciosa* (>10⁶ leucocitos y <10³ bacterias) requirió tratamiento mediante la extracción adicional de la leche después de la toma, y la *mastitis infecciosa* (>10⁶ leucocitos y > 10³ bacterias) se trató eficazmente sólo mediante la extracción de la leche y antibióticos sistémicos. Sin la extracción eficaz de la leche, era más probable que la mastitis no infecciosa progresara a mastitis infecciosa, y la mastitis infecciosa hacia la formación de un absceso (Thomsen y col. 1984). También se relacionaron los contajes de bacterias con los hallazgos clínicos, deduciendo que a partir de los signos clínicos es imposible asegurar si existe o no infección.

6.5.1. Estasis de la leche

La estasis de la leche se produce en el momento en que la leche no se extrae eficazmente del pecho. Esto puede ocurrir cuando los pechos se ingurgitan precozmente después del parto o cuando el niño no extrae la leche que se produce en el pecho, bien parcial o totalmente. Las causas incluyen:

Ingurgitación mamaria

Históricamente, la “fiebre de leche”, caracterizada por hinchazón de los pechos y fiebre alta, se describió en el siglo XVIII. Ocurre alrededor de los 3-6 días tras el parto, cuando normalmente baja la leche y los pechos suelen estar muy llenos. Esto es algo fisiológico y se puede resolver rápidamente mediante la succión eficaz y el vaciamiento de la leche por el niño. Sin embargo, esta situación puede desembocar en ingurgitación (Fildes, 1979). El drenaje venoso y linfático está obstruido, el flujo obstaculizado de leche y la presión en los conductos lácteos y en los alveolos aumenta y ambas

afecciones se confunden a menudo, ya que con la ingurgitación el pecho está repleto tanto de leche como de líquido tisular. Los pechos se ponen hinchados y edematosos.

Tanto en la plétora fisiológica como en la ingurgitación, se afecta habitualmente la totalidad de ambos pechos. Sin embargo existen diferencias importantes (Organización Mundial de la Salud, 1993):

- Un pecho lleno se nota caliente, duro y firme. No está brillante, edematoso o enrojecido. Habitualmente, la leche fluye bien, y a veces gotea espontáneamente. Al niño le resulta fácil succionar y vaciar la leche.

- Un pecho ingurgitado está agrandado, hinchado y doloroso. Puede estar brillante y edematoso con áreas enrojecidas difusas. El pezón puede estar estirado y aplanado. La leche a menudo no fluye fácilmente y puede ser difícil para el niño agarrarse al pecho para succionar hasta que se reduce la hinchazón. Las mujeres a veces tienen fiebre. Sin embargo, habitualmente la fiebre cede en 24 horas.

Frecuencia de las tomas

Gracias a un estudio controlado se demostró que la incidencia de ingurgitación era la mitad cuando los niños tenían acceso al pecho sin restricciones (Illingworth y col. 1952). Con el transcurso del tiempo se observó que cuando se fijaba un horario para las tomas de pecho, era más común la ingurgitación - a menudo seguida por la mastitis- y el fracaso de la lactancia (Ingelman-Sundberg, 1958). Posteriormente, otros autores han descrito una asociación entre la restricción de la frecuencia o la duración de la toma y la mastitis. Muchas mujeres han experimentado que si su hijo pierde una toma o comienza a dormir toda la noche y se incrementa el tiempo entre toma y toma, puede que aparezca la mastitis (Fetherston, 1998). Si la cantidad de leche es abundante, el riesgo de retención aumenta cuando el lactante se salta o retrasa alguna toma (Vogel y col. 1999), situación que puede favorecer el sobrecrecimiento bacteriano.

Agarre al pecho

Desde mediados del siglo XX, se reconoce la importancia de que niño se agarre bien al pecho para que la extracción de la leche sea eficaz. El proceso ha sido investigado y ampliamente descrito y existen técnicas clínicas bien desarrolladas y explicadas (Escott, 1989; Organización Mundial de la Salud, 1993). El mal agarre como causa de extracción ineficaz de leche se contempla actualmente como el principal factor predisponente para la mastitis. Un mal agarre al pecho puede provocar dolor y

traumatismos en el pezón, pudiendo conducir a evitar la alimentación con el pecho afectado y así predisponer a la estasis de la leche y a la ingurgitación (Fetherston, 1998). La anquiloglosia puede interferir con el agarre al pecho y producir grietas y fisuras en el pezón, así como reducir la eficiencia de la extracción de la leche y predisponer a la mastitis (Masaitis y col. 1996), aunque se estima que el 50% de los lactantes con anquiloglosia no experimentan ningún problema (Webb y col. 2013). Existe controversia sobre la repercusión que la frenotomía lingual en los casos de anquiloglosia pueda tener sobre la duración de la lactancia; hay autores que destacan que aumenta la duración (Dollberg y col. 2014) y otros no encuentran una mejora en la misma (Sethi y col. 2013).

A partir de estudios acerca de qué pecho se afecta más a menudo, se han derivado pruebas adicionales de que la causa subyacente de la mastitis es la estasis de la leche de origen mecánico (Inch y col. 1995). Se ha observado que muchas madres encuentran más fácil ponerse al niño en un lado que en el otro y se sugirió que en el lado que les fuese más difícil, podía ocurrir más probablemente un mal agarre responsable de la estasis de la leche y de la mastitis. Se asumió que esto estaría relacionado con una madre diestra o zurda, viendo que el 78% de los casos la mastitis ocurrió en el pecho opuesto al lado preferido. Esto apoya la idea de que la causa subyacente de esta afección es probablemente mecánica.

Otros factores mecánicos

Las grietas, traumatismos y heridas en el pezón, son un factor significativamente asociado a la mastitis (Mediano y col. 2014) y el uso de chupete, biberón y/o tetinas y bombas de extracción o sacaleches pueden tener incidencia sobre el desarrollo de dichas alteraciones (Centuori y col. 1999; Mediano y col. 2014; Qi y col. 2014) y también pueden asociarse con un mal agarre al pecho, ingurgitación y reducción en la frecuencia y duración del amamantamiento (Victoria y col. 1997). Por eso los chupetes pueden interferir con la extracción de la leche y predisponer a su estasis.

Otras situaciones que predisponen a la estasis de la leche incluyen una sobreproducción de leche, o el estar lactando a gemelos o a más niños productos de partos múltiples (Nicholson y col. 1995). Las prendas ajustadas y la posición para dormir en decúbito prono son otros factores mecánicos que se han observado en relación con la mastitis y se han sugerido como causas posibles, aunque las pruebas son puramente anecdóticas.

Mastitis puerperal epidémica

Los problemas pueden aparecer cuando niño y madre se exponen a microorganismos no familiares o virulentos. Se ha considerado a la mastitis epidémica como una enfermedad adquirida en el hospital, causada por cepas altamente virulentas de *S. aureus* resistente a la penicilina (Gibberd, 1953). Desde que se usan antibióticos y bactericidas más poderosos para la limpieza de los hospitales se ha hecho más rara, pero también desde que han estado menos extendidas la alimentación mediante horarios restringidos y la interrupción de la alimentación de un pecho que tiene grietas en su pezón; y desde que los niños se alojan conjuntamente con sus madres en el hospital en lugar de permanecer en salas cuna. Todas ellas prácticas que favorecen la estasis de la leche.

Vía de infección

Un estudio en mujeres con grietas en el pezón, a partir de las cuales se cultivó *S. aureus*, demostró que aquellas que fueron tratadas con un antibiótico sistémico tuvieron 4 a 5 veces menos probabilidad de desarrollar mastitis que las mujeres que fueron tratadas con una preparación tópica, o sólo con corrección de la técnica de lactancia (Livingsstone y col. 1999). Se dedujo que existe la posibilidad de que una grieta proporcione un punto de entrada a la infección. Pero no está claro cómo penetra la infección en la glándula mamaria. Se han llegado a sugerir distintas vías: a través de los conductos lactíferos al interior de un lóbulo; por diseminación hematológica; y a través de una grieta en el pezón al sistema linfático periductal (Gibberd, 1953; Lawrence y col. 2007).

A menudo se observa una asociación entre la infección del pezón por *Candida* y la mastitis, particularmente la mastitis recurrente (Opri, 1982). Es más probable que las grietas en el pezón producidas por la candidiasis pudieran proporcionar un punto de entrada para la infección bacteriana. También es posible que si los pezones están dañados y doloridos como resultado de la candidiasis, una mujer utilice su pecho menos eficazmente, produciéndose la estasis de la leche. Sin embargo, a menudo la candidiasis sucede al tratamiento antibiótico, y puede ocurrir como consecuencia indirecta de la mastitis más que, actuando como factor predisponente.

6.5.2. Factores genéticos

Las interacciones entre el sistema inmune del huésped y el patógeno parecen ser particularmente relevantes en la etiopatogenia de la mastitis (Burton y col. 2003). Normalmente la leche contiene numerosos factores protectores incluyendo IgA, lactoferrina, lisozima y C₃ (un componente del complemento), así como leucocitos. Aunque habitualmente se presta más atención a su importancia para la salud del niño, también ayuda a proteger el pecho de la infección al prevenir que el *S. aureus* llegue a establecerse. El C₃ y la IgA estimulan la fagocitosis del *S. aureus* por los leucocitos en la leche y la lactoferrina aumenta la adhesión de los leucocitos al tejido en el lugar de la inflamación. Como parte de la respuesta inflamatoria, entran en la leche inmunoproteínas adicionales del suero y mayor número de leucocitos. Durante la involución del pecho cuando se interrumpe la lactancia materna hay un aumento de los niveles de inmunoproteínas (Hartmann y col. 1978), y puede que protejan al pecho en este momento en el que la estasis de la leche podría permitir el crecimiento bacteriano.

La existencia de una base genética para las respuestas del huésped a infecciones intramamarias bacterianas ha sido ampliamente documentada en rumiantes y, como ejemplo, se han descubierto loci de rasgos cuantitativos que afectan al riesgo de mastitis por *S. aureus* (Sørensen y col. 2008). Además, se ha sugerido que algunas cepas de estafilococos y estreptococos pueden usar mecanismos de mimetismo molecular que implican antígenos de leucocitos humanos (HLA) específicos del huésped para evadir la respuesta del sistema inmune (Nooh, 2007). Se ha descrito también en la mastitis granulomatosa humana debida a la infección corinebacteriana la asociación con un polimorfismo en el gen NOD2, lo que afecta a la respuesta de los neutrófilos a agonistas de Nod2.

Por otra parte diferencias en los genes determinantes de selectina, antígenos de Lewis y oligosacáridos de la leche humana también pueden predisponer o proteger contra la mastitis mediante la activación de neutrófilos y la producción de especies reactivas de oxígeno. Se conoce además que la leche humana contiene un espectro de sustancias activas, incluyendo péptidos antimicrobianos eucarióticos, tales como la catelicidina LL-37. Este péptido se expresa en la glándula mamaria y secretada en la leche, y muestra una actividad antimicrobiana contra potenciales agentes causantes de mastitis. Polimorfismos o variaciones en el número de copias o en la expresión de genes que codifican la

biosíntesis de tales antimicrobianos péptidos pueden estar vinculados a la susceptibilidad a la mastitis (Fernández y col. 2014).

6.5.3. Factores microbianos

La capacidad de colonizar y, eventualmente, infectar a un huésped depende no sólo de cada especie bacteriana, sino, lo más importante, de cada cepa dentro de una misma especie. La expresión de factores de virulencia, la resistencia a los antimicrobianos, la formación de *biofilms* y la presencia de otros mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped van a determinar la capacidad infectiva del microorganismo así como su permanencia en el epitelio. La comparación de las cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativa aisladas de leche de mujeres con mastitis o mujeres sanas puso de manifiesto el porcentaje de cepas que contienen el operón *ica* relacionado con la formación de biofilms fue mayor en cepas de leche de mastitis que en las de leche de mujeres sanas. La presencia de dicho operón se ha relacionado con el potencial infeccioso de *S. epidermidis* aislado de infecciones provocadas por catéteres contaminados (Vandecasteele y col. 2003). Esto unido a una mayor frecuencia de resistencia a antibióticos como la oxaciclina, eritromicina, clindamicina y mupirocina hace aún más difícil eliminar el sobrecrecimiento de estos microorganismos en los casos de mastitis (Delgado y col. 2009).

6.6. Tratamiento.

Tratamiento antibiótico

Clínicamente debe basarse en un cultivo, identificación y antibiograma. En la tabla 6-3 se relaciona cada tipo de mastitis con los agentes etiológicos, la sintomatología característica y el tratamiento empírico más adecuado. La propuesta de tratamiento está fundamentalmente dirigida a los casos en que no sea posible la realización de cultivos y antibiogramas y/o en los que no se pueda esperar a los resultados para iniciar el tratamiento.

Tabla 6-3. Tipos de mastitis, agentes etiológicos, sintomatología característica y tratamiento empírico.

| Tipos de mastitis, agentes etiológicos, sintomatología característica y tratamiento empírico | | | |
|--|---------------------------------|--|---|
| Tipo | Principales agentes etiológicos | Sintomatología | Tratamiento |
| Agudas | Staphylococcus aureus | Enrojecimiento, aumento de tamaño del pecho Zonas de induración Disminución de la secreción de leche Síntomas sistémicos (fiebres, dolores musculares...) Abscesos | Antibiótico: .- Amoxicilina/ácido clavulánico (1000/62,5mg, cada 8-12h. Durante 7-10 días) .- Cloxacilina .- Cefalosporinas Antiinflamatorios: .- Alternar paracetamol e ibuprofeno, 600mg 2-4 veces/día. |
| | Staphylococcus epidermidis | Dolor en el pecho (pinchazos, calambres, sensación de quemazón) | Probióticos (1x10 ⁹ cfu, 3 veces al día) |
| | Streptococcus mitis | Zonas de induración en el interior del pecho | .- Lactobacillus salivarius |
| | Streptococcus salivarius | Disminución en la secreción de leche | .- Lactobacillus fermentum |
| | Rothia spp. | La leche sale por 1-2 orificios y escurre/gotea | .- Lactobacillus reuteri |
| Subagudas | Corynebacterium spp. | Niños: tomas largas y/o frecuentes Alternan momentos en los que hacen un amargamiento agresivo (tiran del pezón, movimientos característicos de cabeza) | .- Otras especies de Lactobacillus (de venta en farmacias) Antibióticos (en caso de ser ineficaz el tratamiento con probióticos): .- Ciprofloxacino (750mg, cada 12h. Durante 7-10 días) .- Cotrimoxazol Antiinflamatorios: ibuprofeno 600mg, 2-4 veces/día |
| | Staphylococcus epidermidis | Ausencia de dolor | Probióticos (1x10 ⁹ cfu, 3 veces al día) |
| | Streptococcus mitis | Resto similar al de las subagudas | .- Lactobacillus salivarius |
| Subclínicas | Streptococcus salivarius | | .- Lactobacillus fermentum |
| | Rothia spp. | | .- Lactobacillus reuteri |
| | | | .- Otras especies de Lactobacillus (de venta en farmacias) |

Tomado de Carrera y col. 2012.

Ante un cuadro agudo es razonable iniciar un tratamiento antibiótico. Se suele prescribir un betalactámico (cloxacilina o amoxicilina con/sin ácido clavulánico). La opción más recomendable, en ausencia de cultivo, sería amoxicilina+ ácido clavulánico en comprimidos de liberación prolongada. La cloxacilina tiene una eficacia bastante limitada frente *S. aureus* causantes de mastitis, teniendo en cuenta que >50% de las cepas de *S. aureus* causantes de abscesos son resistentes a la metilina (Moazzez y col. 2007). Son preferibles dosis altas de antibiótico que minimice la generación de cepas resistentes.

El tratamiento con betalactámicos puede conducir a tres situaciones:

1. Que el tratamiento sea eficaz y que el problema se solucione por completo, aunque, desafortunadamente, no es la situación más frecuente;

2. Que las cepas de *S. aureus* implicadas sean resistentes, de tal manera que el cuadro no sólo no mejora, sino que se mantiene e incluso puede empeorar al crearse un ambiente propicio para el crecimiento selectivo de dichas cepas, y
3. Que sea eficaz frente a *S. aureus* pero que seleccione el crecimiento de estafilococos coagulasa-negativos o estreptococos.

Este último caso suele ser bastante común, de tal manera que la mastitis aguda se transforma en subaguda y, a partir de ese momento, habría que tratarla como tal. Los betalactámicos no suelen ser muy eficaces frente a los agentes etiológicos de este tipo de mastitis. Por tanto, hay que recurrir a otros antibióticos que tradicionalmente no se han tenido en cuenta durante la lactancia, como el ciprofloxacino (tabla 6-4). La capacidad de este antibiótico para penetrar y difundirse en las biopelículas formadas por *S. epidermidis* es mayor que la de los betalactámicos (Singh y col. 2010). Hace años, hubo cierta controversia sobre el uso de las quinolonas en la lactancia debido a los posibles efectos adversos sobre el cartílago articular de los niños; sin embargo, pronto se demostró que el ciprofloxacino no sólo carece de dicho efecto para la especie humana, sino que se trata de uno de los antibióticos más seguros en neonatología.

Tabla 6-4. Nivel de riesgo y parámetros cinéticos de diversos medicamentos empleados en el tratamiento de las mastitis (Tomado de Carrera M y col. 2012).

| Nivel de riesgo y parámetros cinéticos de diversos medicamentos empleados en el tratamiento de las mastitis | | | | | | | | | |
|---|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---|-------------------------------|---------------------------------|
| Medicamento | Nivel de riesgo ¹ | Peso molecular (daltons) ² | T _{máx} (h) ³ | Unión a proteínas ⁴ | T _{1/2} (h) ⁵ | Índice leche/plasma ⁶ | Biodisponibilidad oral (%) ⁷ | Dosis terapéutica (mg/kg/día) | Dosis relativa (%) ⁸ |
| Amoxicilina | 0 | 365 | 1,5 | 18 | 1,7 | 0,04 | 89 | 0,1 | 0,4 |
| Amoxicilina + ácido clavulánico | 0 | 365 | 1,5 | 18 | 1,7 | 0,04 | 89 | 0,1 | 0,4 |
| Cloxacilina | 0 | 436 | 2 | 90 | 3 | – | 60 | 0,06 | 0,36 |
| Ciprofloxacino | 0 | 331 | 2,3 | 40 | 4 | 2 | 85 | 0,6 | 7,2 |
| Cotrimoxazol | 1 | – | 4 | – | 10 | – | 100 | – | – |
| Paracetamol | 0 | 151 | 2 | 10 | 3 | 1,9 | 85 | 0,9 | 1-4 |
| Ibuprofeno | 0 | 206 | 3 | 90 | 2,5 | 0,01 | 80 | 0,075 | 0,2 |

En este sentido, actualmente se considera un medicamento de riesgo 0 en la lactancia. Así, el tratamiento de una mujer lactante por vía oral con una dosis de 750 mg/12 h significaría que un niño amamantado recibiría una concentración máxima de 0,57 mg/kg/día, una dosis muy inferior a la

habitual (10-40 mg/kg/día) cuando se tratan directamente los neonatos con el mismo antibiótico (Drossou-Agakidou y col. 2004). Además, la pequeña cantidad que llega al niño apenas se absorbe debido a la interferencia causada por el calcio de la propia leche. Finalmente, hay que advertir que los suplementos de hierro (frecuentes durante la lactancia) disminuyen la biodisponibilidad de ciprofloxacino, por lo que reducen su eficacia. El cotrimoxazol, solo o en combinación, podría ser otra opción, ya que suele ser activo frente a estafilococos. En cambio, otros antibióticos, como la eritromicina o la fosfomicina, suelen ser poco efectivos frente a estos agentes, incluso cuando el resultado del antibiograma indica que son teóricamente sensibles.

Staphylococcus epidermidis ha adquirido resistencia a muchos otros antibióticos, como gentamicina, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, fluoroquinolonas y sulfonamidas (Rogers y col. 2009). A pesar de ello, el 80% de las infecciones asociadas a catéteres pueden tratarse con otros antibióticos, como la vancomicina, sin necesidad de retirar el catéter. Éste podría ser el caso de las mastitis, ya que la glándula mamaria durante la lactancia realmente se podría equiparar a un complejísimo «sistema de catéteres»; sin embargo, la vancomicina es uno de los últimos antibióticos eficaces frente a estafilococos multirresistentes, y su uso es exclusivamente hospitalario. Ni siquiera la elección de un antibiótico por antibiograma es garantía de éxito del tratamiento. Las pruebas de resistencia a antibióticos se realizan en condiciones que poco tienen que ver con las que se encuentran en una mastitis, infección que suele caracterizarse por la formación de densas biopelículas en los conductos galactóforos.

Los estafilococos en general, y *S. epidermidis* en particular, muestran una sustancial adaptación al modo de crecimiento en forma de biopelículas, incluyendo la regulación negativa de procesos celulares básicos, como la biosíntesis de ácidos nucleicos, de proteínas y de la pared celular (Yao y col. 2005). Estos cambios en la regulación génica explican por qué la actividad de muchos antibióticos cuya diana son las células bacterianas que crecen activamente (p. ej., penicilinas o aminoglucósidos) es muy limitada frente a las biopelículas de *S. epidermidis*. Además, la capacidad de penetración en una biopelícula varía en función del antibiótico; así, recientemente se ha observado que la capacidad de oxacilina, cefotaxima y vancomicina para penetrar en biopelículas de *S. aureus* o *S. epidermidis* es muy reducida, en contraste con la de amikacina o ciprofloxacino (Singh y col. 2010).

Antiinflamatorios no esteroideos

Cuando la respuesta inmunitaria frente a un microorganismo es demasiado intensa, la propia reacción del hospedador se convierte en corresponsable de la patología y la sintomatología. En tales casos, el problema suele radicar en una inflamación perjudicial para el órgano afectado, independientemente de que el microorganismo haya podido ser controlado o no (Casadevall y col. 2003). Entre los ejemplos de este fenómeno se incluyen enfermedades estafilocócicas, como el síndrome de shock tóxico, cuya patogenia se basa en la excesiva activación de la respuesta inmunitaria frente a una toxina estafilocócica. La situación es similar en las mastitis agudas causadas por *S. aureus* y, en menor medida, en las subagudas. En estas infecciones la terapia antimicrobiana por sí sola fracasa frecuentemente debido a que no reduce la respuesta inflamatoria. Las nuevas direcciones en el tratamiento de enfermedades infecciosas que se caracterizan por una intensa inflamación implican el empleo de tratamientos antiinflamatorios complementarios a los antiinfecciosos (Pirofski y col. 2012). Por ello, la resolución de las mastitis de cualquier tipo en un tiempo prudencial requiere asociar el tratamiento antibiótico con un antiinflamatorio no esteroideo. Es fundamental no solo tratar la fiebre y el malestar de las mastitis agudas, sino también la inflamación en todo tipo de mastitis con 400-600mg de ibuprofeno cada seis horas. Debe tomarse desde el inicio de los síntomas, ya que calma el dolor y disminuye la inflamación, por lo que facilita la eyección de la leche (Espínola-Docio y col. 2016).

Drenaje del pecho

La extracción frecuente y efectiva de la leche es fundamental para tratar la mastitis (Amir, 2014). La extracción más eficaz se realiza con la succión del niño. Para asegurar el adecuado drenaje de la mama, las tomas deben ser frecuentes e iniciarlas por el pecho afecto, realizar masaje de la mama desde la zona bloqueada hasta el pezón y relizar el drenaje completo de los pechos tras la toma (extractor o manual).

Medidas generales (Espínola-Docio y col. 2016)

- Recomendaciones para mantener la lactancia; apoyo emocional para afrontar el dolor y la incomodidad. Aunque existen opiniones contradictorias, se puede evaluar aplicar calor local antes de las tomas y compresas frías después para reducir el edema y el dolor.
- Adecuada nutrición, hidratación y reposo.
- Usar sujetador no apretado.

7. PROBIÓTICOS EN EL TRATAMIENTO DE LA MASTITIS.

En los últimos años, los problemas asociados a la difusión de bacterias resistentes a los antibióticos de relevancia clínica han conllevado un renovado interés por la bacterioterapia, una práctica que hace uso de bacterias probióticas para prevenir o tratar la colonización del hospedador por parte de bacterias patógenas (Rodríguez y col. 2007a; Rodríguez y col. 2007b). La leche humana parece una fuente idónea para obtener bacterias probióticas con las que diseñar nuevas estrategias terapéuticas (Martin y col. 2004; Martin R y col. 2005), entre ellas para la mastitis.

En general, los agentes causantes de las mastitis subagudas y subclínicas son más resistentes a la antibioterapia pero, afortunadamente, responden bastante bien al tratamiento con probióticos. Los probióticos son microorganismos vivos que ejercen efectos beneficiosos sobre un hospedador y tienen diversas aplicaciones, reales o potenciales, en el binomio madre-hijo (Rodríguez y col. 2007a; Rodríguez y col. 2007b). Las bacterias probióticas procedentes de leche materna resultan especialmente interesantes ya que *a priori* están ya adaptadas a la glándula mamaria. Además, su origen y su historial de consumo incluso en bebés garantizan su seguridad para su uso en mujeres durante la lactancia. Recientemente, dos ensayos clínicos han demostrado que ciertos lactobacilos aislados de leche humana representan una alternativa más eficaz que los antibióticos para el tratamiento de las mastitis, y no presentan los efectos secundarios de éstos (candidiasis, trastornos digestivos...).

Aunque sí se tienen datos suficientes sobre la posible eficacia del tratamiento de las mastitis en el ganado bovino, son muy escasos los estudios llevados a cabo en mujeres. De la revisión de la literatura llevada a cabo, solo se han encontrado dos ensayos terapéuticos, dos preventivos y un estudio sobre marcadores de inflamación en mujeres con mastitis tratadas con probióticos. En todos los casos las cepas probióticas utilizadas fueron cepas originarias de leche humana. Dichas cepas fueron seleccionadas en base a su potencial probiótico especialmente en base a sus propiedades antibacterianas e inmunomoduladoras (Lara-Villoslada y col. 2007a). Entre sus propiedades antibacterianas se encontraba una acción inhibitoria directa sobre *Staphylococcus aureus*, uno de los principales agentes causales de mastitis (Olivares y col. 2006).

En el año 2008 se publicó el primer trabajo, doble ciego y con grupo placebo, realizado con dos cepas probióticas originariamente aisladas de leche materna, en el que participaron 20 mujeres que padecían mastitis estafilocócica y que habían recibido antibioterapia sin que hubiese mejorado la sintomatología (Jiménez y col. 2008). Durante el estudio tomaron una combinación de dos cepas de

probiótico, *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 o *Lactobacillus gasseri* CECT 5714, cepas originariamente aisladas de la leche materna y que habían demostrado potencial antibacteriano (Lara-Villoslada y col. 2007a). Se realizó la cuantificación de estafilococos al principio del estudio y a los 30 días; en ambos grupos probióticos se produjo una reducción del recuento de estafilococos en la leche, pero no en el grupo control, e igualmente los síntomas se redujeron en los grupos probióticos aportando mayor bienestar a las pacientes, como la desaparición del enrojecimiento y las grietas del pezón en apenas 14 días, adoptando el seno una apariencia normal (Figura 7-1), mientras que el grupo control permaneció prácticamente invariable. Además, tras los 30 días de tratamiento en 6 de las 10 mujeres que recibieron la mezcla probiótica se pudieron aislar vivas las cepas previamente administradas que fueron identificadas mediante técnicas de biología molecular. Este hecho evidencia el fenómeno de transferencia de microorganismos, desde el tracto gastrointestinal hasta la glándula mamaria, en donde podrían desplazar a las bacterias causantes de la mastitis lactacional. Este estudio tiene especial relevancia pues fue el primero en describir el potencial del uso de bacterias probióticas para tratar la mastitis en mujeres.



Figura 7-1. Areola mamaria a los 0 y 14 días del tratamiento con probióticos.

A raíz de los resultados del estudio anterior, el mismo grupo investigador llevó a cabo un segundo ensayo clínico a mayor escala en el que se comparó la efectividad en el tratamiento de la mastitis de dos cepas probióticas originariamente aisladas de leche de mujeres sanas frente al tratamiento habitual con antibióticos (Arroyo y col. 2010). En el ensayo participaron 352 mujeres

afectadas de mastitis, que se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos. Las mujeres asignadas a los dos grupos con tratamiento probiótico A (n = 124) y B (n = 127) tomaron diariamente durante 3 semanas una dosis del orden de $9\log_{10}$ de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 o *L. salivarius* CECT5713, respectivamente. El tercer grupo (n = 101) recibió el antibiótico prescrito en su centro de salud (amoxicilina con ácido clavulánico, amoxicilina, cotrimoxazol, cloxacilina o eritromicina). Antes de iniciar el tratamiento, el recuento de bacterias en la leche de todas las participantes fue similar (entre 4,35 y 4,47 \log_{10} UFC/ml), siendo *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mitis* las especies predominantes. No se detectaron lactobacilos en ninguna de las muestras. Los síntomas clínicos se evaluaron con una escala arbitraria entre 0 (muy doloroso) y 10 (sin dolor) y la puntuación inicial de todas las mujeres osciló entre 2,01 y 2,35.

Al cabo de las tres semanas que duró el estudio, el recuento de bacterias en la leche de los grupos con tratamiento probiótico no se diferenciaba del que se encuentra habitualmente en las mujeres sanas (entre 2,61 y 2,33 \log_{10} UFC/ml) y era significativamente inferior al del grupo antibiótico (3,28 \log_{10} UFC/ml, $p < 0,001$). Asimismo, en la leche del 53,8% de las mujeres que habían tomado probiótico pudo aislarse el lactobacilo que se les había administrado. En cuanto a los síntomas clínicos, las mujeres de los grupos a los que se habían administrado probióticos mejoraron notablemente (puntuación final entre 8,61 y 8,68) en comparación con las del grupo con tratamiento antibiótico (5,81, $p < 0,001$). De hecho entre el 85-88% de las mujeres que recibieron tratamiento probiótico finalizaron el estudio con una puntuación superior a 8 respecto a sólo un 29% en el grupo con tratamiento antibiótico. Además, el 27% de las mujeres de este último grupo no mejoraron y continuaban refiriendo un nivel de dolor elevado. Como consecuencia de la falta de mejoría el 9% de las mujeres en el grupo que recibió el tratamiento antibiótico acabó abandonando la lactancia. Cabe destacar que el tratamiento con antibiótico dio lugar además a un mayor porcentaje (30,7%) de recurrencias que el tratamiento con probióticos (8,8%). Nueve de las mujeres tratadas con antibiótico desarrollaron candidiasis vaginal, un hecho que no se observó en ninguna de las mujeres a las que se les administró los lactobacilos.

En los estudios anteriores se observa una relación directa entre la mejoría de la sintomatología y la reducción en la carga bacteriana en la leche de la mujer. Recientemente se ha publicado un estudio dirigido a evaluar si esta propiedad de ciertas bacterias probióticas puede ayudar a prevenir el desarrollo de mastitis (Fernández y col. 2016). En el estudio se utilizó de nuevo una cepa originaria de leche humana, *Lactobacillus salivarius* PS2, y participaron 108 mujeres gestantes. Las mujeres se

distribuyeron en un grupo (n=55) que recibió el probiótico diariamente ($9 \log_{10}$) desde la semana 30 de la gestación hasta el momento del parto y un grupo control (n=53) que recibió placebo. La incidencia de mastitis se evaluó durante los 3 primeros meses de lactancia. El porcentaje de mujeres que desarrollaron mastitis en el grupo probiótico (25%, n=14) fue significativamente más bajo que en el grupo control (57%, N=30). Estos resultados son consistentes con una reducción significativa de la concentración en leche de las especies bacterianas relacionadas con la mastitis. Los autores concluyen que la administración del probiótico durante el embarazo puede ser un método eficiente para prevenir la mastitis infecciosa. En el campo de la prevención se llevó a cabo también otro estudio para evaluar el efecto preventivo sobre la mastitis de la cepa *Lactobacillus fermentum* CECT5716 objeto de estudio en esta tesis doctoral (Hurtado y col. 2017). En este estudio participaron 625 mujeres reclutadas en la primera semana justo después del parto que fueron distribuidas en un grupo probiótico, que recibió diariamente una dosis de 3×10^9 UFC/día de la cepa probiótica durante 16 semanas, y un grupo control que recibió un placebo constituido por maltodextrina durante el mismo tiempo. El consumo de la cepa de *L. fermentum* redujo la incidencia de mastitis en más de un 50% respecto al grupo placebo ($p=0.021$). Al igual que en el estudio anterior la reducción en la incidencia de la infección en el grupo probiótico se relacionó con una reducción en la carga de *Staphylococcus* en la leche materna.

Los mecanismos a través de los cuales las bacterias probióticas pueden ejercer su efecto beneficioso sobre la mastitis no están todavía del todo claros. La demostración de que las cepas eficaces sobre la mastitis alcanzan la glándula mamaria unida a las propiedades antibacterianas de estas cepas apunta a fenómenos como la competición o la producción de sustancias bactericidas en el propio epitelio de la glándula mamaria que reducirían la capacidad de los patógenos para proliferar en el conducto mamario. Por otra parte, dado el carácter infeccioso de la mastitis, es muy posible que los efectos inmunomoduladores de estas cepas probióticas activen la respuesta inmunológica de la mujer frente a los patógenos causantes de la mastitis ayudando a controlar la infección. De hecho la administración de ciertas bacterias se ha relacionado con cambios en factores inmunológicos presentes en la leche materna como IgA, TGF- β 2, concentración de neutrófilos (Fernández y col., 2014).

Un estudio dirigido a la identificación de biomarcadores microbiológicos, bioquímicos y / o inmunológicos asociados a la ingesta de la cepa probiótica *L. salivarius* PS2 en mujeres con mastitis mostró una reducción de los recuentos de bacterias lácteas, conteos leucocitarios de leche y sangre y nivel de IL-8 en la leche, así como un aumento en los de IgE, IgG3, factor de crecimiento epidérmico e IL-

7 y una modificación del perfil electrolítico de la leche, y una reducción de algunos biomarcadores de estrés (Espinosa-Marcos y col., 2016). Si bien la reducción en ciertos parámetros inmunológicos como puede ser la IL-8 podrían estar relacionados con la reducción en la inflamación derivado de la reducción en la carga bacteriana en leche tras el tratamiento probiótico, el aumento en inmunoglobulinas o citoquinas estimuladoras de la respuesta inmune como IL-7 son coherentes con que al menos uno de los mecanismos implicados en la eficacia del tratamiento probiótico esté relacionado con el efecto inmunoestimulador de las cepas probióticas.

Los resultados publicados hasta el momento apoyan el uso de bacterias probióticas como estrategia en la prevención y tratamiento de la mastitis. Las bacterias originarias de leche materna parecen las más apropiadas para abordar este problema, sin embargo son necesarios más estudios para definir la cepa o cepas más eficaces así como las condiciones de empleo y posología adecuadas para conseguir la máxima eficacia.

8. *Lactobacillus fermentum* CECT5716

8.1 Origen e identificación.

Lactobacillus fermentum CECT5716 es una cepa que fue originariamente aislada de leche materna (Martín y col, 2003). *L. fermentum* CECT5716 ha sido identificada y caracterizada mediante técnicas bioquímicas, moleculares y genéticas en diferentes centros de investigación, como The Institute Food Research (UK) y NIZO (Holanda). La clasificación taxonómica de la cepa se llevó a cabo mediante secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S. Con el fin de discriminar la cepa respecto a otras cepas pertenecientes a la misma especie se llevaron a cabo análisis por RAPD-PCR con los cebadores previamente descritos ArgDei y OPL5 (Martín y col, 2003). El patrón de fermentación de carbohidratos también corroboró la identidad de la cepa como perteneciente a la especie *L. fermentum* (Martín y col, 2005).

8.2 Caracterización.

8.2.1 Seguridad

La especie *Lactobacillus fermentum* está incluida en el listado QPS (Qualified Presumption of Safety) publicado por la EFSA. Este listado recoge las especies microbianas consideradas como seguras para su uso en humanos debido a su historial de consumo. Las especies incluidas en esta lista no requieren de estudios de seguridad para su puesta en el mercado. Sin embargo, con el fin de garantizar al máximo la seguridad de la cepa *L. fermentum* CECT5716 se llevó a cabo por el grupo de investigación un estudio exhaustivo de diferentes aspectos relacionados con la seguridad. Por una parte el genoma total de la cepa fue secuenciado y analizado (Cárdenas N y col, 2015). La secuencia muestra que la cepa no contiene plásmidos y no contiene genes implicados en la biosíntesis de aminas biógenas. Ningún profago podría ser inducido. También se llevó a cabo el análisis de actividades no deseables como la degradación de mucinas o la producción de beta-glucuronidasa (Martín R. y col 2005; Cárdenas N y col, 2015).

Otro aspecto importante relacionado con la seguridad es el patrón de resistencias a antibióticos que presenta la cepa. Con el fin de evitar la posible transferencia de genes de resistencia a microorganismos patógenos o potencialmente patógenos, la EFSA requiere que se demuestre que las cepas que se van a utilizar para consumo humano o animal no presenten resistencias a antibióticos

potencialmente transferibles. *L. fermentum* CECT5716 no contiene genes transmisibles que pudieran estar relacionados con resistencias a antibióticos (Cárdenas y col, 2015). El patrón de resistencias a antibióticos mostrado por *L. fermentum* CECT5716 corresponde a las resistencias inherentes a la especie descritas como no transferibles (Lara-Villoslada y col, 2009).

La inocuidad de la cepa se confirmó en un estudio de toxicidad subcrónica en roedores. En dicho estudio los animales recibieron diariamente durante 4 semanas dosis de *L. fermentum* CECT5716 del orden de 1×10^{10} UFC/día. Dicha dosis, equivalente a que un humano se tomara hasta 10.000 raciones diarias durante 1 mes, fue perfectamente tolerada por los animales y no dio lugar a ningún efecto adverso (Lara-Villoslada y col, 2009).

Por último hay que añadir que hasta la fecha se han realizado numerosos estudios clínicos que han involucrado a cientos de voluntarios sin que se haya detectado efecto adverso ninguno.

8.2.2 Caracterización del potencial probiótico

Una característica singular de *L. fermentum* CECT5716 es su capacidad para producir glutatión, molécula con gran potencia antioxidante. Esta propiedad se ha relacionado con su capacidad protectora del epitelio intestinal en los modelos animales de inflamación intestinal (Perán y col, 2006). La cepa es capaz también de producir riboflavina y folatos que podrían ser producidos in situ una vez la bacteria colonizara el intestino (Cárdenas y col, 2015).

Entre las características que se consideran importantes para las cepas probióticas se encuentran aquellas relacionadas con que la bacteria alcance viva el intestino con el fin de que pueda ejercer su acción. Para ello la bacteria debe de sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal. *L. fermentum* CECT5716 mostró una alta resistencia a estas condiciones simuladas en modelos in vitro (Martín y col, 2005). Además en los estudios llevados a cabo en humanos demostraron que la cepa se recupera viva en heces tras su administración por vía oral (Olivares y col, 2007).

El potencial probiótico de *L. fermentum* CECT5716 se ha evaluado a través de numerosos ensayos tanto in vitro como in vivo en animales de experimentación.

8.2.2.1 Caracterización potencial antiifecioso

Algunos probióticos tienen la capacidad de producir sustancias con actividad antimicrobiana, como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, etc. Estas sustancias afectan a la viabilidad de microorganismos no deseados, y además, alteran su metabolismo y la producción de toxinas. Los ensayos *in vitro* llevados a cabo en modelos de difusión en agar pusieron de manifiesto la capacidad de *L. fermentum* CECT5716 para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos como *E. coli* (tabla 8-1).

Tabla 8-1. Ensayos de difusión en agar.

| Cepa | <i>Salmonella choleraesuis</i> | | | <i>Escherichia coli</i> | | <i>Staphylococcus aureus</i> | | Listeria | Clostridium | Σ (mm) |
|------------------------------|--------------------------------|-----|-----|-------------------------|------|------------------------------|------|----------|-------------|------------------|
| | 4155 | 409 | 443 | 433 | 4076 | 976 | 4013 | Scott A | NZ8 | |
| <i>L. fermentum</i> CECT5716 | 12 | 15 | 19 | 12 | 0 | 12 | 18 | 17 | 0 | 105 |

Resultados expresados como mm de diámetro del halo de inhibición producido por un sobrenadante de *L. fermentum* CECT5716 concentrado 10x.

Σ es la suma de los mm del halo para las 9 cepas patógenas testadas

Una barrera esencial que protege el epitelio intestinal de agresiones e infecciones es la capa de mucus que recubre el intestino. *L. fermentum* CECT5716 ayuda a mantener la capa de mucus a través de la inducción de la expresión de MUC2 y MUC5B (Olivares y col, 2006).

Cuando los patógenos alcanzan la mucosa intestinal es necesaria su adhesión a la mucosa como prerequisite para la colonización e invasión de los tejidos subepiteliales, en caso contrario son eliminados rápidamente del intestino del hospedador. *L. fermentum* CECT5716 es capaz de competir con los microorganismos patógenos presentes en el lumen intestinal impidiendo que éstos alcancen la mucosa intestinal, y por tanto que se adhieran a las mucinas y penetren en el epitelio intestinal (figura 8-1).

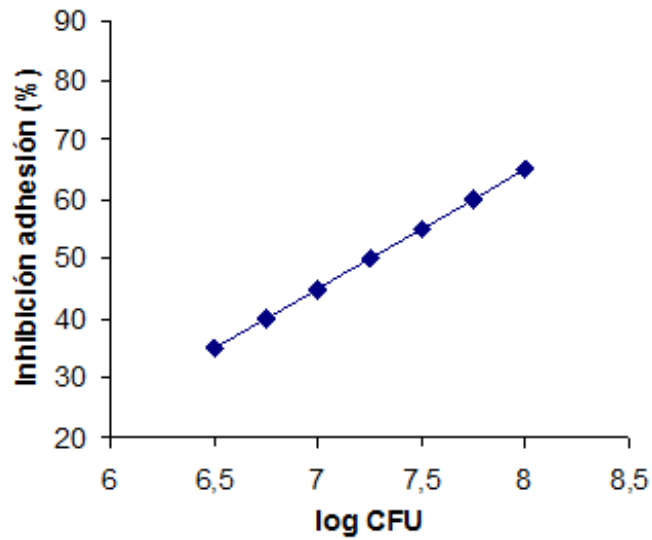


Figura 8-1. Inhibición de la adhesión a células intestinales de cerdo de *S. choleraesuis* marcada con fluorescencia y en condiciones de competencia a diferentes dosis de *L. fermentum* CECT5716

El potencial antiinfeccioso de *L. fermentum* CECT5716 se corroboró en un modelo en roedores de infección por Salmonella. La administración de la cepa durante las 2 semanas previas a la infección protegió de forma significativa a los animales (figura 8-2) (Olivares y col, 2006).

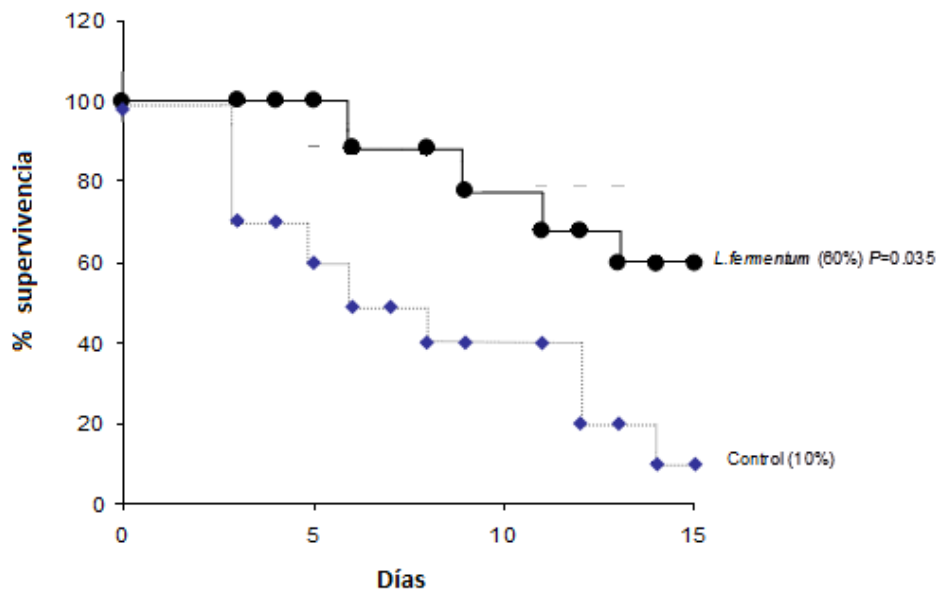


Figura 8-2. Mortalidad por infección de *S. choleraesuis* (5×10^6 ufc) en ratones tratados y no tratados con *L. fermentum* CECT5716 (1×10^8 ufc/día durante 2 semanas).

8.2.2.2 Caracterización potencial inmunomodulador.

Durante los últimos años, se ha propuesto que la microbiota intestinal puede ser modulada positivamente por la administración de bacterias o sustratos bacterianos, y, en cierta medida, esto podría conducir a una modulación significativa del sistema inmune. Los mediadores de estas interacciones son en gran parte desconocidos, aunque la superficie y las moléculas de la envoltura de la célula se han identificado como algunos de los jugadores principales. Entre ellos, podemos distinguir entre proteínas y otros componentes, tales como peptidoglicano, exopolisacáridos, ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos (Hevia y col, 2015)

La capacidad de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 para modular la respuesta inmunológica ha sido estudiada en modelos celulares *in vitro*. En los modelos llevados a cabo con polimorfonucleares obtenidos de sangre periférica humana se puso de manifiesto la capacidad de la cepa probiótica para interactuar con las células del sistema inmune modificando la respuesta tanto del tipo innato como específico. Respecto a inmunidad innata, la presencia de la cepa probiótica activó las células NK, especialmente el subtipo CD8 + que muestran un mayor potencial citotóxico que las del subtipo CD8-. Con respecto a la inmunidad adquirida, aproximadamente el 9% de los linfocitos T CD8 + se convirtió en activado después del cultivo con *L. fermentum* CECT5716. Aunque hubo una menor activación de las células T CD4 + se activaron fundamentalmente el subtipo T reguladoras (CD4 + CD25 + Foxp3 +). La adición de la cepa probiótica indujo también cambios significativos en la producción de un gran número de citoquinas y quimiocinas como TNF α , IL-1b, IL-8, MIP-1a, MIP-1b, y GM-CSF destacando especialmente su capacidad para inducir IFN- γ (Pérez-Cano y col, 2010). Este efecto sobre la producción de citoquinas fue observado también en un modelo celular de macrófagos derivados de médula ósea de ratón (Díaz-Roperó y col, 2007). En dicho modelo se puso de manifiesto que el efecto de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 sobre el sistema inmune era dependiente del estado de activación del sistema inmune. Así en condiciones basales la adición de *L. fermentum* induce una activación de la respuesta inmunológica mientras que en condiciones de sobreestimulación como puede ser una inflamación crónica la adición de la cepa probiótica provoca una modulación de la respuesta a través de la inducción de la producción de citoquinas reguladoras como la IL-10 (Díaz-Roperó y col, 2007). Este doble efecto de

L. fermentum CECT5716 se corroboró en ensayos *in vivo* llevados a cabo tanto en modelos de animales sanos como en modelos de inflamación (Díaz-Roperó y col, 2007; Peran y col 2005). En el caso de los modelos de inflamación se utilizaron modelo de inflamación intestinal en ratas inducidos por ácido

trinitrobenzenosulfónico (TNBS). La administración de *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 de forma preventiva antes de inducir el daño inflamatorio redujo los daños macroscópicos causados por esta enfermedad a nivel del epitelio intestinal, viéndose los efectos reflejados en una reducción de la necrosis a nivel del epitelio intestinal y un aumento en cuanto a la regeneración de la mucosa. La infiltración de neutrófilos en el tejido fue menor en el caso de los animales que recibieron la cepa probiótica. Por otra parte los niveles de TNF α , una citoquina eminentemente proinflamatoria, así como otros marcadores de inflamación se redujeron de forma significativa como consecuencia del consumo de *L. fermentum* CECT5716 (Perán y col, 2006 ; Perán y col, 2007). La capacidad antiinflamatoria de la cepa también se puso de manifiesto en un modelo animal de shock séptico por administración de lipopolisacárido (Arribas y col, 2008).

8.3 Efectos beneficiosos en humanos.

8.3.1 Efectos del consumo de L. fermentum CECT5716 sobre la respuesta inmune frente a la vacuna de la gripe en una población adulta sana.

El estudio puso de manifiesto el poder inmunomodulador de la cepa probiótica mejorando de forma significativa la respuesta de anticuerpos frente a la vacuna de la gripe. El efecto se relacionó con una mejora tanto de la respuesta innata como de la respuesta específica. La ingesta de la cepa probiótica también se relacionó con una menor incidencia de infecciones de carácter respiratorio, probablemente debido a una mejor respuesta inmunológica frente a los patógenos relacionados con este tipo de infecciones (Olivares y col, 2007).

8.3.2 Efectos en niños del consumo de una fórmula infantil con L. fermentum CECT5716 desde los 6 meses hasta los 12 meses de edad.

Por una parte el estudio demostró que la cepa probiótica era bien tolerada y segura para los niños. Por otra parte se demostró que el consumo de la fórmula infantil probiótica se relacionó con una reducción significativa del 46% en la incidencia de infecciones intestinales ($p=0.032$) y del 26% en la incidencia de infecciones respiratorias ($p=0.026$) (Maldonado y col, 2012). Los mecanismos a través de los cuales la cepa probiótica ejerce este efecto protector probablemente estarán relacionados con las propiedades antibacterianas e inmunomoduladoras que posee esta cepa.

8.3.3 Efectos del consumo de *L. fermentum* CECT5716 sobre la mastitis.

Como se ha comentado en el capítulo 7 un estudio publicado en 2010 (Arroyo y col, 2010) reveló el potencial de *L. fermentum* CECT5716 para el tratamiento de la mastitis en mujeres durante la lactancia. El efecto se relacionó con la capacidad de la cepa probiótica para reducir la carga bacteriana en leche materna. El tratamiento probiótico no sólo solventó los síntomas clínicos de la mastitis en un 88% de las mujeres que recibieron el tratamiento probiótico sino que además redujo la recurrencia de la infección y previno del abandono de la lactancia. Los mecanismos a través de los cuales la bacteria ejerce este efecto no están todavía del todo claros aunque probablemente estarán también relacionados con las propiedades antibacterianas e inmunomoduladoras que posee esta cepa.

2.- JUSTIFICACIÓN

Como hemos ido describiendo a lo largo de esta memoria, algunos de los beneficios de la lactancia materna podrían ser atribuidos, al menos en parte, a la capacidad de la leche humana de generar una microbiota intestinal más favorable que aquella que se observa en niños alimentados con las distintas fórmulas infantiles que hasta ahora podríamos encontrar en el mercado.

Históricamente se pensaba que este efecto era debido a los oligosacáridos y otros factores presentes en la leche humana que condicionan la colonización del tracto intestinal. Sin embargo, actualmente se sabe que la leche humana contiene además bacterias con carácter probiótico, que probablemente también desempeñan un papel clave en la colonización inicial del intestino del recién nacido.

En este sentido y con el fin de que los niños alimentado con fórmula láctea desarrollen un perfil de microbiota intestinal similar al que desarrollan los niños alimentado con leche humana, las fórmulas infantiles están comenzando a incluir oligosacáridos y bacterias probióticas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en su formulación. Si bien las últimas opiniones de los expertos apoyan la seguridad de las fórmulas probióticas en niños de más de 6 meses, se recomienda la realización de estudios de seguridad específicos para cada cepa. Además, los expertos advierten de la necesidad de llevar a cabo más estudios en niños lactantes de corta edad así como contemplar en los estudios una fase de seguimiento que evalúe la seguridad de las cepas a largo plazo, incluso una vez que el niño ha dejado de tomarlo. Según la ESPGHAN este tipo de estudios son necesarios para dilucidar el papel de los probióticos en niños cuya microbiota intestinal no está todavía establecida y que, por tanto, pueden verse influenciados de manera más positiva por este tipo de bacterias.

Por otro lado, los principales agentes etiológicos de mastitis infecciosas pertenecen a los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*. *Lactobacillus fermentum* CECT5716 es una cepa que se encuentra de forma natural en leche de madres sanas, habiéndose demostrado que su ingesta por mujeres con mastitis infecciosa reduce significativamente la presencia de las bacterias patógenas en la leche.

El dolor en el pecho es un fenómeno relativamente frecuente durante la lactancia que se ha relacionado con un desequilibrio en la microbiota presente en la leche de la madre. La capacidad de

Lactobacillus fermentum CECT5716 para reducir la carga de bacterias patógenas en la leche hacen pensar que esta cepa probiótica podría ayudar también en esos casos de dolor durante la lactancia que, sin llegar a desarrollar una mastitis aguda, causan un problema de dolor en la madre que en mayor o menor medida puede dar lugar al abandono de la lactancia natural.

Conviene resaltar los posibles efectos beneficiosos que se pretenden obtener a la conclusión del mismo, así como remarcar la seguridad del mismo para las voluntarias:

- Los datos preclínicos y clínicos sobre la cepa objeto de estudio son suficientes para garantizar que los riesgos para el sujeto en quien se realiza el estudio son admisibles.
- El estudio se basa en los conocimientos actuales disponibles y la información buscada, presumiblemente, supone un avance en el conocimiento científico sobre el ser humano o para mejorar su estado de salud.
- El diseño del estudio minimiza los riesgos para los sujetos participantes en el mismo.
- La importancia de la información buscada justifica el riesgo al que se exponen los sujetos participantes en el estudio.

3.- OBJETIVOS

Objetivo 1.

Evaluar la seguridad de la adición de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 en una fórmula de inicio en niños de 1 a 6 meses. Según la ESPGHAN este tipo de estudios son necesarios para dilucidar el papel de los probióticos en niños cuya microbiota intestinal no está todavía establecida y que, por tanto, pueden verse influenciados de manera más positiva por este tipo de bacterias.

Objetivo 1a.

- ✓ Evaluar la seguridad a corto plazo durante el tiempo de consumo de la fórmula probiótica.

Objetivo 1b.

- ✓ Evaluar la seguridad a largo plazo del consumo de la fórmula probiótica durante los primeros meses de vida. Evaluación a los 3 años de edad.

Objetivo 1c.

- ✓ Evaluar si el consumo de la fórmula probiótica influye sobre la incidencia de enfermedades infecciosas.

Objetivo 2.

Evaluar la capacidad de *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 para reducir la carga de *Staphylococcus* en la leche de mujeres con dolor de pecho e ingurgitación mamaria durante la lactancia.

4.-MATERIALES Y MÉTODOS

**1.- SEGURIDAD A CORTO PLAZO DEL CONSUMO PRECOZ DE LACTOBACILLUS FERMENTUM
CECT5716: SEGUIMIENTO A LOS SEIS MESES DE EDAD.**

1.1.- Diseño del estudio.

Inicialmente se tuvo en cuenta el tamaño de la muestra que se necesitaba. Para ello se estimó el resultado primario que era el aumento de peso promedio de los recién nacidos entre el valor inicial y 120±3 días de edad. Apoyándonos en la base de las publicaciones anteriores en las que se observaba que el crecimiento fue la variable de resultado primaria como parte de un estudio de seguridad y, de acuerdo con el informe del Comité Científico de la Comisión Europea sobre la Alimentación Humana (*European Commission Scientific Committee on Food*), se procedió a diseñar un estudio para tener un poder estadístico capaz de detectar una diferencia en la ganancia de peso igual a 0,5 desviaciones estándar, con un nivel de significación del 2,5% y una potencia del 80%. Los abandonos no fueron incluidos en este cálculo.

Se realizó un diseño para un estudio de intervención nutricional, donde la captación tendría lugar en el Hospital Virgen de las Nieves (Granada), el Hospital Reina Sofía (Córdoba) y el Hospital Carlos Haya (Málaga), con una única aleatorización generada por un programa de ordenador (SIGESMU®), considerando un estudio doble ciego y contando con 2 grupos de estudio: control y probiótico.

El estudio se presentó al Comité de Ética de la Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental – Alejandro Otero- (FIBAO); realizándose en condiciones de respeto a los derechos fundamentales de la persona y a los postulados éticos que afectan a la investigación biomédica con seres humanos, siguiendo los contenidos de la declaración de Helsinki y sucesivas actualizaciones.

Se obtuvo el consentimiento informado, libremente expresado y firmado, de cada uno de los padres o tutores de los sujetos del estudio antes de su inclusión, tal y como exige el artículo 12 del Real Decreto 561/1993 con fecha de 16 de abril. El estudio contaba con una póliza de seguros con la empresa HDI Seguros.

El ensayo se registró en la Biblioteca de Medicina (www.clinicaltrials.gov) con el número NCT01346644.

Diseño general y esquema del estudio

El estudio se planteó con dos fases claramente diferenciadas entre sí:

- Fase 1: desde la captación hasta el 6º mes de vida de los niños. Fue la intervención nutricional, durante la cual se llevó a cabo la recogida de muestras de heces y se realizaron revisiones pediátricas (figura 1).
- Fase 2: desde el 7º mes hasta el año de edad de los niños, donde simplemente los lactantes se sometían a revisiones de salud, llevadas a cabo por el pediatra.

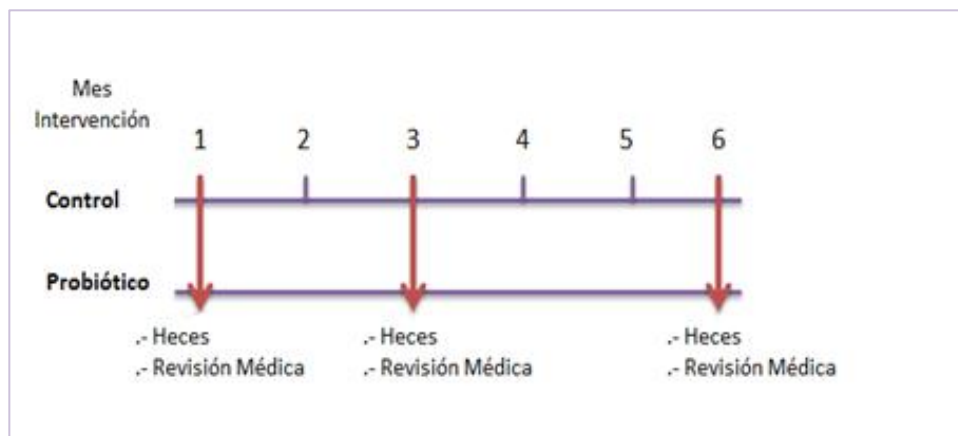


Figura 1. Esquema general del estudio (Fase 1).

En el momento del reclutamiento, los padres o tutores de los voluntarios debían de rellenar un cuestionario sobre la alimentación del niño hasta ese momento, el estilo de vida que llevaban ellos (tabaquismo, mascotas, etc...), si contaban con antecedentes familiares de enfermedades, o si el niño padecía o había padecido alguna patología.

Se recogieron un número de cuatro muestras fecales frescas simultáneas de cada uno de los voluntarios al inicio del estudio (1 mes de edad), 3 y 6 meses de edad, que se conservaron a -20°C . Tres de las muestras fueron utilizadas para evaluar los diferentes parámetros analizados, y la muestra restante se almacenó a -80°C (de reserva para posibles repeticiones analíticas).

Los padres recibieron un cuaderno de recogida de datos, donde anotaban los datos antropométricos, el número diario de deposiciones, cantidad diaria de fórmula consumida, las visitas médicas no programadas, el comportamiento y las molestias gastrointestinales.

^a Deposiciones / día

| | | | | |
|-----------|-------|-------|--------|------------|
| ‡ < 1 vez | ‡ 1-3 | ‡ 4-6 | ‡ 7-10 | > 10 veces |
|-----------|-------|-------|--------|------------|

^b Color de heces

| | | | | |
|----------|---------------------------------|----------|--------|---------|
| Amarillo | Amarillo-verde-marrón (mostaza) | ‡ Marrón | ‡ Gris | ‡ Verde |
|----------|---------------------------------|----------|--------|---------|

^c Consistencia

| | | | | |
|--------------------|----------------|------------------|---------------------------|-----------|
| muy dura (bolitas) | ‡ dura (pasta) | ‡ blanda (pasta) | muy blanda (casi líquida) | ‡ líquida |
|--------------------|----------------|------------------|---------------------------|-----------|

^d Flatulencia

| | | | | |
|---------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 0 horas | ‡ < 3 horas | ‡ 3-6 horas | ‡ 6-12 horas | ‡ > 12 horas |
|---------|-------------|-------------|--------------|--------------|

^e Regurgitación

| | | | | |
|------|---|---|--------------------|-------------------|
| nada | poca cantidad durante la comida o poco después de la comida | ‡ gran cantidad durante la comida o poco después de la comida | ‡ pequeños vómitos | ‡ grandes vómitos |
|------|---|---|--------------------|-------------------|

^f Horas de sueño (durante las últimas 2 noches)

| | | | | |
|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| ‡ < 4 horas | ‡ 4-6 horas | ‡ 6-9 horas | ‡ 9-12 horas | ‡ > 12 horas |
|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|

^g Horas de sueño totales durante las últimas 48h

| | | | | |
|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| < 11 horas al día | ‡ 11-14 horas al día | ‡ 14-17 horas al día | ‡ 17-20 horas al día | ‡ > 20 horas al día |
|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|

^h Temperamento

| | | | | |
|-----------------------|-------------|----------|------------|---------------|
| ‡ cansado, adormilado | ‡ tranquilo | ‡ activo | ‡ excitado | ‡ muy agitado |
|-----------------------|-------------|----------|------------|---------------|

En cada una de las visitas médicas, el pediatra relleno una encuesta referente al motivo de la consulta y al estado inicial de salud del niño, con especial atención a la posibilidad de que el voluntario presentara algún tipo de reacción adversa que pudiese estar relacionada con la intervención nutricional. Así mismo, realizaban el diagnóstico de las enfermedades infecciosas en base a los síntomas específicos y definiciones estandarizadas. Una vez concluido el tratamiento se continuaba con la pauta de controles médicos normales en niños de esa edad, en los cuales se recogieron datos sobre la salud.

Población del estudio.

Se vertebraron unos criterios de selección que los voluntarios habían de cumplir obligatoriamente para poder participar en el estudio:

Criterios de inclusión:

- Recién nacidos a término (37-42 semanas de edad gestacional) sanos que, por razones ajenas al estudio, abandonaran la lactancia materna durante el primer mes de vida.
- Firma del consentimiento informado por parte de los padres o tutores.

Criterios de exclusión.

- Antes del estudio:
 - o Ser alérgicos a la proteína de la leche de vaca.
 - o Ser intolerantes a la lactosa.
 - o Padecer alguna enfermedad metabólica grave.
 - o Padecer alguna enfermedad gastrointestinal (historia de la diarrea crónica o estreñimiento, reflujo gastroesofágico).
 - o Recibir algún tipo de medicación o estar recibiendo antibióticos.
 - o Baja expectativa de cumplimiento con el protocolo del estudio.
- Durante el estudio:
 - o Se les diagnostique alergia a las proteínas de la leche de vaca.
 - o Se les diagnostique intolerancia a la lactosa.
 - o No estén cumpliendo con el protocolo del estudio.
 - o Los padres o tutores del niño decidan que su hijo abandone el estudio.
 - o Sufrir algún acontecimiento adverso, derivado del consumo de cualquiera de las fórmulas del estudio, no tolerado por el voluntario.
 - o Padecer regurgitación grave y / o cólico por cuyo motivo el pediatra le prescribiese una fórmula especial.

Descripción de los tratamientos:

Se trata de un estudio a doble ciego controlado por placebo que finalmente incluyó a 126 niños que se dividieron en 2 grupos:

- Grupo control, que recibieron un preparado para lactantes convencional [Puleva Peques 1, con CNF: 200345.3], complementada con galactooligosacáridos (GOS) (0,3 g / 100 ml) (n=63)

- Grupo probiótico, que recibieron el mismo preparado para lactantes anterior complementado con GOS (0,3 g/ 100ml) y adicionado de 10^7 UFC/g de la cepa *Lactobacillus fermentum* CECT5716. (n=63)

Los cultivos probióticos Hereditum®, entre los que se encuentra *L. fermentum* CECT5716, son producidos por Biosearch Life en sus instalaciones de Granada.

Los preparados para lactantes se proporcionaron a través de Puleva Food SL (Granada, España) en contenedores blancos idénticos, marcadas con un número de código que hacía referencia a los grupos de estudio. Con el fin de garantizar el cegamiento de la prueba, los dos preparados para lactantes fueron sometidos a una prueba sensorial por un panel de expertos que encontraron que ambos productos eran idénticos. Los pediatras prescribieron las cantidades de fórmula por día que debían tomar los bebés y las directrices para la alimentación complementaria.

Variables del estudio.

Variables principales de respuesta:

- Incidencia de acontecimientos adversos: un acontecimiento adverso se define como cualquier episodio no deseado que se produzca en un voluntario durante su participación en el estudio, se considere o no relacionado con el mismo. Estos efectos adversos se evaluaron siguiendo el criterio establecido por la Norma Europea ISO 14155-1, relativa a la protección de los participantes de estudios clínicos, según la cual un acontecimiento adverso se considera grave si:
 - Amenaza la vida del voluntario
 - Provoca un deterioro de la salud, es decir, causa una enfermedad o lesión potencialmente mortal o una insuficiencia permanente o un ingreso hospitalario o una intervención médica o quirúrgica para prevenir una insuficiencia.

Todos aquellos acontecimientos adversos que no cumplan los criterios de “grave” se consideran “no graves”. Estos datos se recogieron en los cuadernos de recogida de datos.

- Crecimiento de los voluntarios: en cada una de las revisiones pediátricas se consignaron el peso, la longitud y el perímetro craneal de los niños.

Variables secundarios de respuesta:

- Microbiota intestinal de los niños.
- Concentración fecal de AGCC (acetato, butirato, propionato)
- Concentración fecal de IgA.
- Incidencias de infecciones.

1.2.- Cuantificación de bacterias en heces.

La cuantificación de las bacterias en las heces se realizó por técnicas microbiológicas clásicas siguiendo el protocolo descrito por Maldonado y col (2012).

Para la detección de *L. fermentum* CECT5716, las muestras de heces fueron dispersadas (100 mg/ml) en tampón de solución salina de peptona y se extendió en agar MRS. Después de un período de incubación de 48 h a 37 °C y en condiciones anaerobias, las colonias se recolectaron y se suspendieron en agua destilada. La cepa *L. fermentum* CECT5716, de la que se conoce la secuencia total de su genoma, se detectó en estas suspensiones bacterianas gracias a una estrategia basada en PCR anidada. Los cebadores y sondas fueron diseñados utilizando el software Primer Express (Applied Biosystems) procedente de una secuencia de ADN genómico específico de la especie identificada por hibridación sustractiva genómico de ADN.

Resumiendo, para la primera reacción de amplificación estándar se usaron los siguientes oligonucleótidos como cebadores:

- HSL40 126D (5_-GCTTGCCGCTTCTCTGGT-3_) y HSL40 126R (5_-CAACGACGATGAACACCACTT-3_) a 500 nm en un equipo Eppendorf Mastercycler Gradient y Taq ADN polimerasa (Roche).

Las condiciones de PCR fueron un paso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 46 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, y una

extensión final a 72 °C para 3 minutos. El resultado de la amplificación y el tamaño del amplicón (222 pb) se confirmó por electroforesis en gel de agarosa.

La segunda amplificación fue un ensayo de PCR basado Taq-Man, cuya secuencia se encuentra dentro del producto de la primera PCR. Los cebadores en esta ocasión fueron:

- LC40C126D (5_- TCAACGGCCCCTTCAATACA -3_) y LC40C126D (5_- GACCTAATTCAGTCAAACATATTTTAC-3_) a 500 nm y la sonda (P LC40C126 5_- AGTGGTGAGATGCCAGTGTCCCG-3_, Joe y BHQ1 marcado) a 250 nm.

La amplificación y detección se llevaron a cabo en un termociclador Stratagene Mx3005P, usando Taq ADN polimerasa (Roche) e incubando 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto.

1.3.- Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

Las muestras fecales se homogeneizaron con NaHCO₃ 150 mM (pH 7,8) (1: 5 wt/v) en una atmósfera de argón. Las muestras se incubaron durante la fermentación durante 24 horas a 37 °C y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción. La extracción de AGCC se realizó por cromatografía de gases siguiendo el protocolo descrito en Maldonado y col (2012).

1.4.- Cuantificación de IgA fecal.

La concentración de IgA se midió en los sobrenadantes de las heces mediante un kit de cuantificación de ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (Bethyl, Montgomery, TX).

1.5.- Análisis estadístico.

El software estadístico utilizado para realizar el análisis fue R versión 2.12.2 (<http://www.R-project.org/>) y el SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Los modelos estadísticos aplicados a los resultados primarios y secundarios se ajustaron principalmente por el tiempo, el grupo de tratamiento,

el sexo y la edad al inicio del estudio con el fin de corregir las diferencias en la edad de inicio del bebé en el ensayo, las diferencias entre los géneros y el hospital. Puesto que no había diferencias entre los hospitales, el análisis final no incluía el hospital como covariable y no se tuvo que realizar ningún ajuste.

Para el análisis de medidas repetidas en el tiempo, y con el fin de tener en cuenta la correlación de las respuestas dentro de los sujetos, se aplicó un modelo lineal mixto. Cuando las variables del estudio fueron las respuestas continuas como las medidas del período de intervención, se aplicaron modelos de regresión lineal (LRM) para ajustar la media de las covariables de interés. Para las respuestas de resultados basados en eventos recuentos o valores dicotomía, se aplicaron modelos lineales generalizados (GLMs). En particular, para el número de eventos se ajustó el modelo de regresión de Poisson con la función de enlace de registro, y de la aparición se utilizó un modelo de regresión logística. Las pruebas se realizaron en el nivel de significación de dos caras 5% y se obtuvieron los intervalos de confianza del 95% para las estimaciones.

2.- SEGURIDAD A LARGO PLAZO DEL CONSUMO PRECOZ DE LACTOBACILLUS FERMENTUM CECT5716: SEGUIMIENTO A LOS TRES AÑOS DE EDAD.

2.1.- Diseño del estudio.

Una vez concluido el estudio de seguridad en recién nacidos, analizados sus datos y obteniendo resultados positivos, se prosiguió el estudio ampliándolo hasta que los niños alcanzaran la edad de 3 años, tiempo en el que se tenía previsto volver a realizar un seguimiento de los parámetros antropométricos (peso, talla y perímetro craneal) y de la salud de los participantes (vacunas, historial familiar y clínico), así como un análisis de su microbiota fecal, para valorar si la ingesta del probiótico continuaba siendo segura al haber transcurrido un tiempo considerable (figura 2).

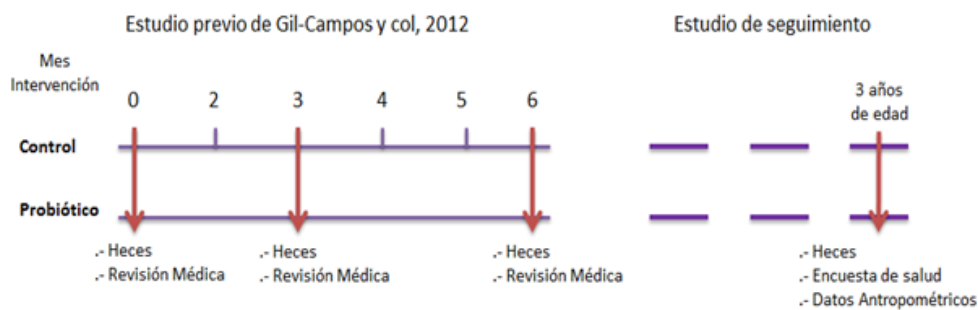


Figura 2. Esquema general del estudio.

Todo se planteó respetando la legislación vigente y realizando una adenda al Comité Ético sobre el estudio anterior refiriéndola como una ampliación del mismo, con su correspondiente ampliación del seguro, basándose en las recomendaciones que los expertos aconsejan en cuanto a la realización de estos estudios de seguimiento a largo plazo.

Una vez recibida la aprobación, fue necesario recoger muestras fecales de los voluntarios que ya participaron en el estudio anterior (Gil-Campos y col, 2012), conforme iban alcanzando la edad de 3 años. La recogida de muestras se rigió por el protocolo habitual, es decir, fueron recogidas en botes estériles y conservadas a -80°C en las instalaciones de Biosearch S.A. hasta su posterior análisis.

Cepas bacterianas y condiciones de siembra.

Para poder realizar en análisis de la microbiota fecal de los niños era necesario tener unas muestras patrón que sirvieran de ayuda para elaborar una recta de calibrado donde referenciar las distintas muestras que se fuesen obteniendo.

Las distintas cepas bacterianas se sembraron por agotamiento en sus correspondientes medios y condiciones durante 48 horas (tabla 1). Posteriormente, se preparó un inóculo de cada cepa recogiendo una colonia del medio y sembrándola en 100 ml de un caldo de cultivo de su medio correspondiente en un matraz estéril, cónico, confiriendo las condiciones metabólicas necesarias para cada bacteria de crecimiento, es decir, durante 48 horas a 37 °C con agitación (150 rpm, 250 rpm, excepto *E. coli*) y en condiciones de anaerobiosis para todos los géneros bacterianos, excepto *E. Coli* que crece en condiciones aeróbicas.

Tabla 1. Cepas bacterianas usadas.

| <i>Especie</i> | Origen | Medio | T°C | Condiciones |
|---------------------------|----------|---|------|--------------|
| <i>E.Coli</i> | CECT352 | LB | 37°C | aerobiosis |
| <i>L. Coryniformis</i> | CECT5711 | MRS (1264441) | 37°C | anaerobiosis |
| <i>B. Breve</i> | CECT7263 | RCA (CM0151) | 37°C | anaerobiosis |
| <i>C. Sphenoides</i> | CECT796 | RCA (CM0151) | 37°C | anaerobiosis |
| <i>B. Thetaiotamicron</i> | DSMZ2079 | Columbia Broth (CM0331) con 5% sangre de caballo desfibrinada | 37°C | anaerobiosis |

Una vez que se obtuvo un crecimiento adecuado de los inóculos, se centrifugó y concentró el pellet obtenido en 10 ml del mismo medio de cultivo. Se midió su densidad óptica a 600 nm y se sembraron 100 µl de los distintos concentrados obtenidos a las siguientes concentraciones: 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ y 10⁹; realizándose este procedimiento por triplicado para comprobar que tanto la repetitividad como la reproducibilidad sean correctas.

2.2.- Cuantificación de las bacterias presentes en las heces del niño

La cuantificación se llevó a cabo usando el kit de extracción “Maxwell kit 16 Total Viral Nucleic Acid Purification” junto al equipo de extracción “Maxwell 16”.

La muestra inicial de heces de cada niño se diluyó en agua de peptona hasta obtener una concentración de partida de 100 mg/ml, de donde se tomaban 200 µL que se mezclaban con otros 200 µL del tampón de lisis (incluido en el kit de purificación) y 20 µL de proteinasa K (20 mg/ml). Tras 15 minutos de incubación a 56 °C en agitación, la mezcla de heces se transfería a una cartucho de purificación (Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, Promega) y se realizaba el protocolo específico indicado por el Maxwell 16 extractor (Promega) hasta obtener finalmente 50 µL de una solución de DNA.

La población microbiológica se determinó mediante el análisis y cuantificación de 5 grupos bacterianos: *Lactobacillus* spp; *Bifidobacterium* spp; *Clostridium* spp; *Bacteroides* spp and *Escherichia coli* spp. La cuantificación molecular se hace por qPCR usando SYBR® green como fluróforo (PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix with ROX™, Quanta Biosciences) y oligos específicos ^{1,2,3,4} para cada grupo bacteriano (tabla 2).

Se aplica un perfil térmico común para todas las cepas bacterianas: 95 °C durante 3 minutos seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Se alcanza una curva final de fusión desde 50 °C a 95 °C, obteniendo unos datos de Ct (valores umbrales de ciclo) para cada muestra y grupo bacteriano gracias a una reacción de amplificación con 0,5 µL de ADN en un volumen final de 20 µL, que es interpolado mediante una curva específica de calibrado para calcular la concentración expresada en UFC/g.

Las curvas de calibración se establecieron previamente usando heces humanas esterilizados, tal y como se ha explicado con anterioridad, las cuales se doparon con cantidades conocidas de cepas bacterianas que pertenecen a cada grupo bacteriano analizado (tabla 1). El rango dinámico, la eficiencia de amplificación y el factor de correlación de cada curva se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Oligos, rango dinámico, eficiencia de amplificación y el factor de correlación de cada curva.

| Grupo Bacteriano | Cepa usada en estándares | Primers | | | Curvas de calibración | | |
|---------------------|------------------------------------|-----------|------------------------|------------|-----------------------|----------------|----------------|
| | | Nombre | Secuencia (5'-3') | Referencia | Rango (UFC/g) | Eficiencia (%) | r ² |
| Lactobacillus sp. | <i>L. coryniformis</i> CECT5711 | L159_F(A) | GGAAACAGATGCTAATACCG | 1 | 3,27E9 - 3,27E4 | 117,8 | 0,972 |
| | | L159_f(g) | GGAAACAGGTGCTAATACCG | | | | |
| | | L677_R | CACGCGTACACAATGGAG | | | | |
| Bifidobacterium sp. | <i>B. breve</i> CECT7263 | G-bifid-R | GGTGTCTTCCCGATATCTACA | 2 | 1,36E9 - 1,36E5 | 116,6 | 0,981 |
| | | G-bifid-F | CTCCTGGAAACGGGTGG | | | | |
| Escherichia coli | <i>E. coli</i> CECT352 | E.coliR | ACCAGGGTATCTAATCCTGTT | 3 | 1,87E9 - 1,87E7 | 84,5 | 0,992 |
| | | E.coliF | GTTAATACCTTTGCTTCATTGA | | | | |
| Clostridium sp. | <i>C. sphenoides</i> CECT796 | G-Ccoc-R | CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA | 4 | 1,86E9 - 1,86E5 | 111,3 | 0,974 |
| | | G-Ccoc-F | AAATGACGGTACCTGACTAA | | | | |
| Bacteroides sp. | <i>B. thetaiotamicron</i> DSMZ2079 | G-bfra-R | CCAGTATCAACTGCAATTTTA | 2 | 5,32E9 - 5,32E6 | 102,4 | 0,987 |
| | | G-bfra-F | ATAGCCTTTGAAAGRAAGAT | | | | |

Referencias:

- 1.- Heilig HGJ y col, 2002.
- 2.- Matsuki T y col, 2002.
- 3.- Malinen E y col, 2003.
- 4.- Matsuki T y col, 2004.

2.3.- Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en las heces

Para poder cuantificar los AGCC contenidos en las heces, se procedió a la homogeneización de las muestras con 150 mM NaHCO₃ (pH 7,8) (1:5, wt/v) en una atmósfera de argón y se incubaron durante 24 horas a 37 °C para su fermentación. Tras ello, se procedió a su conservación en ultracongeladores a una temperatura de -80 °C, donde permanecieron hasta que se procedió a realizar la extracción de los AGCC, técnica que se llevó a cabo mediante la realización de una cromatografía de gases, siguiendo el protocolo descrito por Maldonado y col (2012).

2.4.- Cuantificación de IgA en las heces

La concentración de la Inmunoglobulina A se midió en los sobrenadantes de las muestras fecales ya homogeneizadas mediante un kit específico de ELISA para la determinación de IgA en humanos, siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante (Bethyl, Montgomery, TX).

2.5.- Análisis estadístico.

Para el análisis de los datos de referencia se utilizó el test de Chi-cuadrado para las variables categóricas y la prueba t de Student se aplicó para las variables continuas.

Los modelos estadísticos aplicados a los resultados primarios y secundarios fueron ajustados por el tiempo, el grupo de tratamiento, el género y la cesárea. De las otras variables de interés medidos obtenidos a partir de los bebés, sus familiares o las condiciones de vida, se han tenido en cuenta sólo aquellas que fueron estadísticamente significativas y relevantes para estimar el efecto de los tratamientos.

Se aplicó un modelo lineal mixto (LMM) para analizar medidas repetidas en el tiempo. Cuando las variables del estudio fueron las respuestas continuas como las medidas del período de intervención, se aplicaron modelos de regresión lineal (LRM) para ajustar la media de las covariables de interés. Para las respuestas de resultados basados en eventos recuentos o valores dicotomía, se aplicaron modelos lineales generalizados (GLM). En particular, para el número de eventos (infecciones) el modelo de regresión de Poisson con la función de enlace de registro. Las pruebas se realizaron en el nivel de significación de dos caras 5% y se obtuvieron los intervalos de confianza del 95% para las estimaciones.

El software estadístico utilizado para realizar el análisis fue R versión 2.12.2 (<http://www.R-project.org/>) y el SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

3.- *Lactobacillus fermentum* CECT5716 EN MADRES LACTANTES QUE SUFREN DOLOR DE PECHO

3.1.- Diseño del estudio.

Tipo de estudio

Se diseñó un estudio de intervención nutricional multicéntrico para tener acceso a un mayor número de voluntarias y que fuese más heterogéneo, con una aleatorización única, doble ciego y que constase de 4 grupos de estudio: 1 grupo control y 3 grupos probióticos diferentes entre sí por la dosis final del probiótico. Para el cálculo del tamaño muestral que se necesitaría para que los resultados obtenidos tuvieran una suficiente potencia estadística, se tuvo en cuenta que la variable principal del estudio era el recuento de bacterias en leche y por tanto, si se quería observar una diferencia de $1 \log_{10}$ con una potencia estadística de 0,80 y un nivel de significación de 0,05, necesitaríamos un mínimo de 20 voluntarias por grupo.

La aleatorización de las voluntarias se realizó mediante una lista de números aleatorios generada por ordenador con el programa SIGESMU, el cual iba asignando un grupo: A, B, C o D. Los sujetos fueron aleatorizados de forma estrictamente secuencial, teniendo en cuenta que si una voluntaria abandonaba el ensayo, el número de aleatorización que le fue asignado no sería de nuevo reutilizado.

El estudio se presentó al Comité de Ética del Hospital Materno Infantil Virgen de las Nieves de Granada. Dicho estudio respetó en todo momento los derechos fundamentales de la persona y a los postulados éticos que afectan a la investigación biomédica con seres humanos, siguiéndose a estos efectos los contenidos en la declaración de Helsinki y sucesivas actualizaciones.

Desde la empresa se garantizaba la confidencialidad de los datos a cada voluntaria, documentándose todo ello mediante la firma del consentimiento informado, libremente expresado, de cada uno de los sujetos del estudio antes de su inclusión, en los términos del artículo del Real Decreto 223/2004 con fecha 6 febrero. Señalar que la empresa contaba con una póliza de seguros realizada en exclusividad para dicho estudio que cubriese a todos los sujetos que participaran en el mismo.

Diseño general y esquema del estudio

El estudio se diseñó para que tuviese una duración de 4 semanas iniciales de tratamiento, dividido en 4 visitas (1 por semana), y un posterior periodo de seguimiento del estado de salud de la voluntaria (figura 3).

En la visita 1 se informaba de todo lo que implicaba el estudio y se solicitaba el consentimiento informado en caso de que la voluntaria estuviese a favor de participar. Se revisaba el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión, se aleatorizaba y se le explicaba las pautas del tratamiento que debería seguir, los datos que debería recoger y las citas médicas a las que debería acudir. Se cumplimentaba el cuestionario de valoración del dolor (MQP) y encuesta nutricional, y se le tomaba la muestra inicial de leche.

En las visitas 2, 3 y 4 correspondientes a las semanas 1, 2 y 3 de intervención, se volvía a recoger una muestra de leche, se realizaba la encuesta de valoración del dolor y la encuesta nutricional.

Las muestras de leche (5 ml) se recogían en condiciones asépticas en tubos estériles que eran congelados inmediatamente hasta su posterior análisis que se llevaba a cabo en el plazo de 7 días.

Se realizó un seguimiento de las mujeres durante 4 meses tras la intervención con el fin de recoger los datos de incidencia de mastitis.

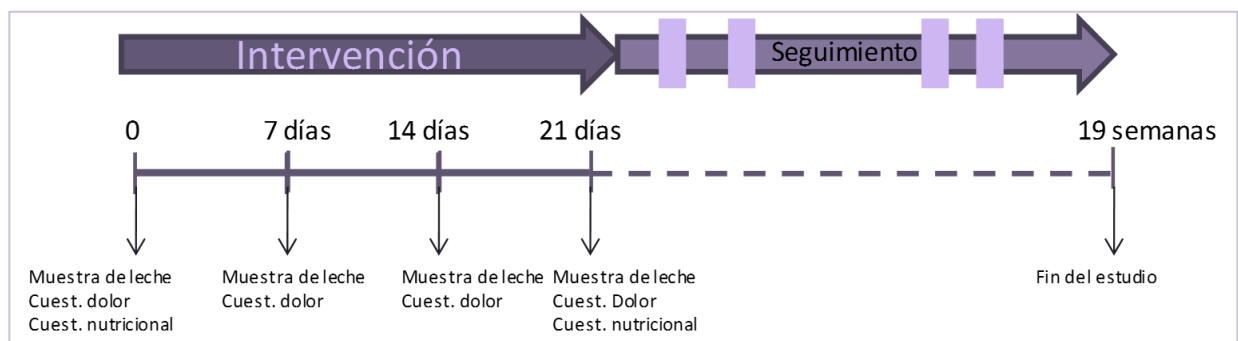


Figura 3. Esquema general del estudio.

Población del estudio.

Se vertebraron unos criterios de selección que habían de cumplir obligatoriamente las voluntarias para poder ser incluidas en el estudio:

Criterios de inclusión:

- Mujeres en periodo de lactancia
- Inflamación y/o calor en el pecho
- Dolor en el pecho
- Recuento bacterias totales en leche mayor o igual a 4 log₁₀ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml

Criterios de exclusión

- Abscesos mamarios, síndrome Raynaud y otras patologías mamarias con excepción de la ingurgitación mamaria.
- Tratamiento antibiótico.
- Baja expectativa de cumplimiento con el protocolo del estudio.

Aquellas mujeres que cumplían los criterios, al tener la sintomatología de ingurgitación mamaria, eran informadas de la posibilidad de participar en el estudio. En caso de aceptar y comenzar el estudio, también se dictaminaron unos criterios, que en caso de no cumplir, conllevaría la exclusión inmediata del estudio de las voluntarias, con el único fin de mantener el rigor científico, no adulterar los resultados y no condicionar en ningún momento a las voluntarias. Estos criterios de exclusión que pudieran darse durante el estudio eran los siguientes:

- La voluntaria no se ceñía al protocolo, y por tanto lo incumplía.
- La voluntaria notificaba su deseo expreso de abandonar el estudio voluntariamente.
- La voluntaria requería algún tratamiento antibiótico.
- La voluntaria sufría algún acontecimiento adverso que obliga a su exclusión del estudio.

Descripción de los tratamientos:

La administración del producto experimental y del placebo se llevó a cabo en forma de cápsula.

- **Probiótico:**
 - *L. fermentum* CECT5716 en una concentración de 3×10^9 ufc/día (1 cápsula al día).
 - *L. fermentum* CECT5716 en una concentración de 6×10^9 ufc/día (2 cápsula al día).
 - *L. fermentum* CECT5716 en una concentración de 9×10^9 ufc/día (3 cápsula al día).
 -
- **Placebo:**
 - Maltodextrina (1 cápsula al día)

Preparación de los cultivos microbianos.

Los cultivos probióticos (Hereditum®), entre los que se incluye el *L. fermentum* CECT5716, objeto de este estudio, son producidos por Biosearch Life en sus instalaciones industriales de Granada.

Su mezcla y encapsulación se realizó en sala blanca, conservándose las cápsulas a 4 °C durante todo momento, antes y durante el estudio. De esta forma asegurábamos que la viabilidad del probiótico fuese estable a lo largo del estudio

Variables del estudio.

a) Variables principales de respuesta:

- Recuento de bacterias totales en leche.

b) Variables secundarias de respuesta:

- Evaluación del dolor (Cuestionario valoración de dolor de McGill) (Melzack, 1975; Melzack, 1987; Lahuerta y col. 1982)
- Recuentos *Staphylococcus*, *Streptococcus*
- Recuentos *Lactobacillus*
- Progresión hacia mastitis (tratamiento antibiótico)
- Marcadores inflamatorios (IL-8)

Evaluación de la respuesta:

Muestras de leche:

- Nº de muestras: 4 en total distribuidas de la siguiente forma:

- En el momento de la captación
- 1 semana de intervención
- 2 semanas de intervención
- 3 semanas de intervención (final de la intervención)
-
- Parámetros:
 - Bacterias totales
 - Recuentos de *Staphylococcus* y *Streptococcus*
 - Recuento de *Lactobacillus*
 - Parámetros de inflamación (IL-8)

Revisiones médicas:

- Nº de revisiones: 4 en total: 0, 1, 2, 3 semanas. (En caso de recurrencia la mujer acudiría de nuevo a la consulta)
- Parámetros:
 - Encuesta de valoración del dolor (semanal)
 - Encuesta nutricional al inicio y final de la intervención

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

Las especies se sembraron por agotamiento en sus medios y condiciones correspondientes durante 48 horas (Tabla 3).

Tabla 3. Cepas bacterianas usadas.

| <i>Cepa</i> | Origen | Medio | Temperatura | Condiciones |
|---------------------|-----------------|----------|-------------|--------------|
| <i>S. aureus</i> | CECT4013 | NB - BHI | 37°C | aerobiosis |
| <i>L. fermentum</i> | <u>CECT5711</u> | MRS | 37°C | anaerobiosis |
| <i>S. mutans</i> | CECT479 | BHI | 37°C | aerobiosis |

Para estandarizar los cultivos, se realizaron los cálculos correspondientes para obtener 1 ml de leche humana autoclavada y dopada con 3×10^6 UFC/ml de cada microorganismo, por duplicado (muestra A y la muestra B). Por otra parte, se sembraron diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10000 de cada uno de los microorganismos y se incubaron 24 horas, excepto *S. mutans* que se dejó durante 48 horas, bajo las condiciones especificadas en la tabla 1 para comprobar mediante contaje clásico que el dopaje realizado con las cepas bacterianas a la leche estaba a la concentración deseada. Una vez realizado este contaje, se obtuvo la concentración exacta de cada microorganismo con la que se había dopado la muestra de leche (tabla 4)

Tabla 4. Contaje de colonias en la dilución 1/10000.

| | | | | | Media (ufc/ml) |
|---------------------|---|-----|-----|-----|--------------------|
| <i>S. aureus</i> | A | 71 | 64 | 79 | $7,13 \times 10^6$ |
| | B | 53 | 75 | 59 | $6,23 \times 10^6$ |
| <i>L. fermentum</i> | A | 47 | 54 | 49 | $5,00 \times 10^6$ |
| | B | 36 | 21 | 36 | $3,10 \times 10^6$ |
| <i>S. mutans</i> | A | 566 | 129 | 251 | $3,15 \times 10^7$ |
| | B | 515 | 93 | 532 | $3,80 \times 10^7$ |

Posteriormente, se recogieron 750 μ L de cada uno de los microorganismos para hacer una mezcla A y una mezcla B, dopadas con los 3 microorganismos a estudio. La concentración de cada uno de ellos en la mezcla se expresa en la tabla 5.

Tabla 5. Concentración de cada microorganismo en la mezcla

| Mix | <i>S. aureus</i> | <i>L. fermentum</i> | <i>S. mutans</i> |
|----------|--------------------|---------------------|--------------------|
| A | $2,38 \times 10^6$ | $1,67 \times 10^6$ | $1,05 \times 10^7$ |
| B | $2,08 \times 10^6$ | $1,03 \times 10^6$ | $1,27 \times 10^7$ |

Se tomaron 1,08 ml de cada una de las muestras y se realizaron diluciones seriadas desde 1/10 hasta 1/100000. Se trasvasó 1 ml de cada una de las diluciones en un eppendorf y se realizó una

extracción de ADN, siguiendo el método que se explica en la sección 2.3. Finalmente se cuantificó mediante qPCR para obtener la recta patrón de calibrado.

3.2.- Cuantificación de bacterias de leche materna.

Cuantificación de bacterias de leche materna por el método clásico.

En este caso se realizó una cuantificación usando placas del medio PCA (Plate Count Agar, CM0325, OXOID), donde se siembra la muestra, se incuba y se lleva a cabo un recuento total de bacterias. Para su realización, inicialmente se procedió a la realización de diluciones seriadas de las distintas muestras de leche materna a analizar desde la dilución 1/10 hasta la dilución 1/1000.

Se tomaron 100 µl de cada dilución, incluyendo también de la muestra inicial, y se realizó la siembra por agotamiento en placa. La siembra se realizó por duplicado: durante 48 horas de incubación una placa se dejó bajo condiciones anaeróbicas y otra placa en condiciones aeróbicas. Tras la incubación se realizó un recuento total de las colonias que hayan crecido y se observen a simple vista.

Cuantificación de ADN bacteriano de leche maternal mediante qPCR.

- Extracción de ADN bacteriano de *Streptococcus* y *Staphylococcus*:

Inicialmente y de forma repetida se invirtió suavemente la muestra de leche materna para conseguir homogeneizarla. Seguidamente se traspasó a un eppendorf un volumen de un 1 ml y se le añadieron 0,5 ml de EDTA 0,5M con 0,1% Tergitol, y se procedió a invertir suavemente varias veces el eppendorf para conseguir una buena mezcla y homogeneización. Una vez que se tuvo la alícuota perfectamente homogeneizada, se prosiguió la extracción de ADN tal y como se indica en el método descrito por Cressier y Bissonnette N (2011). Se finalizó centrifugando durante 5 minutos a 13.000 G para recoger el sobrenadante del eppendorf, donde se encuentra la solución de AND, descartando el resto.

- Extracción de ADN bacteriano de *Lactobacillus*:

Para la extracción del ADN de esta cepa se usó el kit EZNA Stool DNA (Omega Bio-tek). A 1 ml de la muestra de leche maternal se le añadieron 0,5 ml de EDTA 0,5 M con Tergitol 0.1% (w/v), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras este tiempo, se centrifugó durante 10

minutos a 14.000 G, tras lo cual se retiró todo el sobrenadante y los residuos de grasa que contenga la leche materna. Seguidamente, se resuspendió el pellet bacteriano en 200 µL de agua estéril y se traspasó completamente a un microtubo de 2 ml de FastPrep® que contenía 200 mg de perlas de vidrio y se continuó el proceso según las instrucciones facilitadas por el fabricante del EZNA Stool DNA kit.

La población microbiológica se realizó mediante el análisis y cuantificación de 3 grupos bacterianos: *Lactobacillus* spp; *Streptococcus* spp; and *Staphylococcus* spp. La cuantificación molecular se llevó a cabo por qPCR usando SYBR® green como fluoróforo (PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix with ROX™, Quanta Biosciences para las cepas *Streptococcus* y *Staphylococcus*; y Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix, Agilent, para *Lactobacillus*) y oligos específicos para cada grupo bacteriano (tabla 6).

Se aplicó un perfil térmico común para la amplificación de las 3 cepas: 95 °C durante 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 35 segundos. Se alcanzó una curva final de fusión desde 55 °C a 95 °C, obteniendo unos datos de Ct para cada muestra y grupo bacteriano gracias a una reacción de amplificación con 2 µL de ADN en un volumen final de 20 µL, que fue interpolado mediante una curva específica de calibrado para calcular la concentración expresada en UFC/g.

Los patrones utilizados en la recta de calibrado se establecieron previamente usando muestras de heces esterilizadas, suplementadas con una concentración conocida de las distintas cepas bacterianas a analizar (tabla 1).

Tabla 6. Oligos, rango dinámico, eficiencia de amplificación y el factor de correlación de cada curva.

| Grupo Bacteriano | Cepa usada en estándares | Primers | | | Curvas de calibración | | |
|--------------------|---------------------------------|---------------|--------------------------|------------|-----------------------|----------------|----------------|
| | | Nombre | Secuencia (5´-3´) | Referencia | Rango (UFC/g) | Eficiencia (%) | r ² |
| Lactobacillus sp | <i>L. coryniformis</i> CECT5711 | L159_F(A) | GGAAACAGATGCTAATACCG | 1 | 1,67E5 - 1,03E2 | 108,9 | 0,982 |
| | | L159_f(g) | GGAAACAGGTGCTAATACCG | | | | |
| | | L677_R | CACGCGTACACAATGGAG | | | | |
| Streptococcus sp. | Streptococcus sp. | Strepto sp fw | AGATGGACCTGCGTTGT | 2 | 1,06E6 - 1,06E3 | 84,6 | 0,981 |
| | | Strepto sp rv | GCTGCCTCCCGTAGGAGTCT | | | | |
| Staphylococcus sp. | Staphylococcus sp. | TStaG422 | GGCCGCTTGAACGTGGTCAAATCA | 3 | 2,38E5 - 2,08E2 | 108,9 | 0,976 |
| | | Tstag765 | TIACCATTTAGTACCTTCTGGTAA | | | | |

Referencias

- 1.- Heilig GHJ y col, 2002.
- 2.- Dalwai F y col, 2007.
- 3.- Martineau F y col, 2001.

3.3.- Cuantificación de IgA en leche materna.

De las muestras de leche homogeneizadas, se tomó una alícuota de los sobrenadantes para poder determinar la concentración de la IgA mediante un kit específico de ELISA para la determinación de IgA en humanos, siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante (Bethyl, Montgomery, TX).

3.4.- Cuantificación de IL-8 en leche materna.

La medida de la concentración de IL-8 en las muestras de leche se realizó con la ayuda de un kit de ELISA específico para la determinación de IL-8 en humanos siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante (Diaclone SAS) partiendo de unas alícuotas de cada muestra.

3.5.- Análisis estadístico.

El análisis de las diferencias en el efecto del tratamiento se realizaron utilizando test paramétricos (prueba de varianza) y no paramétricos (Kruskal-Wallis) cuando se trataba de datos repetidos en el tiempo o mediante la prueba de chi-cuadrado para respuestas binarias o categóricas.

Finalmente, se realizó un análisis más robusto y preciso a través de la modelización estadística para determinar el efecto del tratamiento, estando este ajustado por el tiempo y las covariables expresadas en el párrafo anterior. Además, se estudió la asociación entre los parámetros bioquímicos y las puntuaciones de dolor mediante la inclusión de estos parámetros como covariables en el modelado de los resultados relacionados con dolor.

Se aplicó un modelo lineal mixto (LMM) para analizar medidas repetidas en el tiempo. Cuando las variables del estudio fueron las respuestas continuas como las medidas del período de intervención, se aplicaron modelos de regresión lineal (LRM) para ajustar la media de las covariables de interés. Para las respuestas de resultados basados en eventos recuentos o valores dicotomía, se aplicaron modelos lineales generalizados (GLM) y un modelo de regresión de Poisson cuando los datos estaban relacionados con el número de eventos observados. Las pruebas se realizaron en el nivel de significación de dos caras 5% y se obtuvieron los intervalos de confianza del 95% para las estimaciones.

El software estadístico utilizado para realizar el análisis fueron SPSS versión 19 (IBM, Armonk, NY) y R versión 3.0 (<http://www.R-project.org/>).

1.- SEGURIDAD A CORTO PLAZO DEL CONSUMO PRECOZ DE LACTOBACILLUS FERMENTUM CECT5716: SEGUIMIENTO A LOS SEIS MESES DE EDAD.

1.1. Población.

En los distintos centros sanitarios que colaboraron en este proyecto, se informó a 158 padres sobre todo el contenido y desarrollo del estudio, de los cuales finalmente 137 bebés fueron incluidos en el mismo, con su consiguiente aleatorización. De los 137 recién nacidos, 16 abandonaron el ensayo: 11 en el grupo control y 5 en el grupo experimental. Los abandonos durante la intervención se debieron al cambio de domicilio fuera del área de estudio (1 en el grupo de control), el cambio de fórmula debido a reflujo gastroesofágico (2 en grupo control y 2 en grupo probiótico), el consumo de otros tipos de preparados para lactantes (1 en grupo probiótico) y la pérdida durante la intervención debido a un mal cumplimiento y violación del protocolo (8 en grupo control y 2 en grupo probiótico). El número total de voluntarios analizados, por protocolo, a los 4 meses fue de 126 (63 por grupo), y a los 6 meses el número descendió hasta los 121 lactantes (60 en el grupo control y 61 en el grupo probiótico). Un diagrama de flujo de los participantes se muestra en la figura 1.

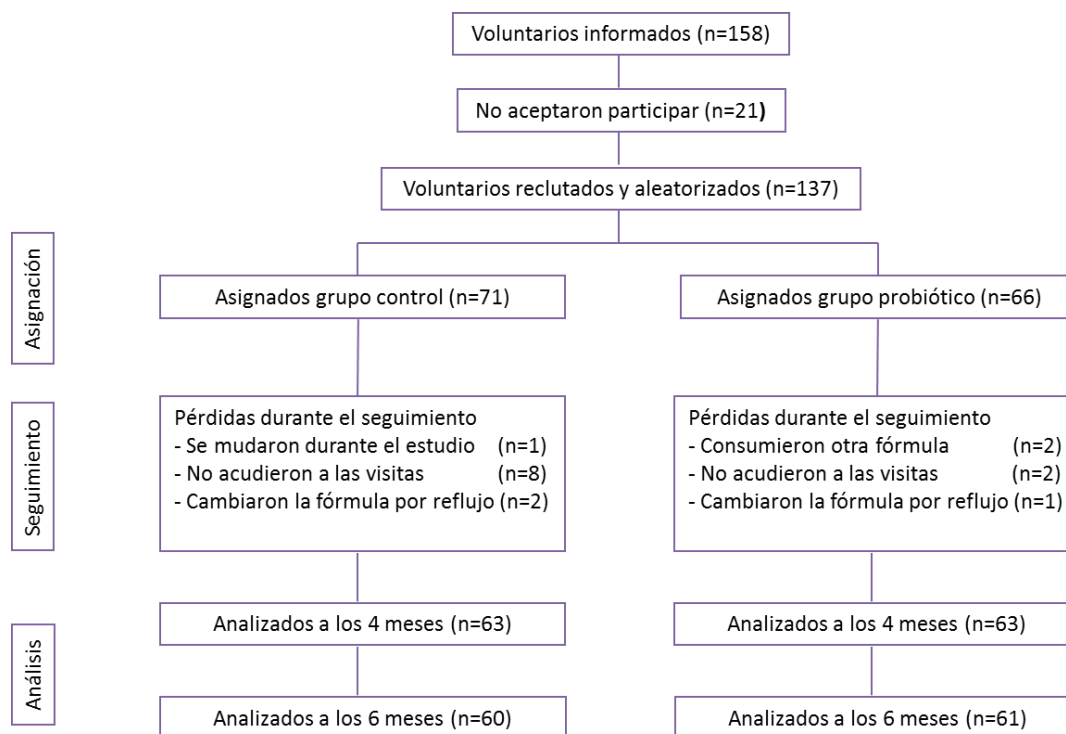


Figura 1. Diagrama de flujo de participantes.

Se analizaron las características basales de los 121 lactantes que completaron el período de intervención con el fin de descartar que hubiera diferencias de partida entre los dos grupos que pudieran afectar a los resultados finales. Entre las variables que se consideraron importantes por poder tener un impacto sobre el crecimiento y salud del bebé se encontraban medidas antropométricas, parámetros relacionados con la gestación y parto, historial médico de la madre y familiares directos, fumadores en el entorno del bebé, contacto con hermanos o asistencia a guardería y contacto con animales. Puesto que la vacunación frente al rotavirus puede tener un impacto sobre la incidencia de diarreas y dado que no es una vacuna obligatoria se recogió también este dato. No se detectaron diferencias significativas entre el grupo control y probiótico para ninguna de las variables, por tanto, se consideró que la muestra era homogénea y ambos grupos eran comparables (tabla 1).

Tabla 1. Características basales de los participantes en el estudio.

| | Grupo Control (n=60) | Grupo probiótico (n=61) |
|---|---------------------------------|------------------------------------|
| Niño/niña (%) | 38/22 (63/37) | 34/27 (56/44) |
| Edad al comenzar el estudio (semanas), media±SD | 4,3 ± 1,1 | 4,3 ± 0,5 |
| Peso al nacer (kg), media±SD | 3,15 ± 0,6 | 3,24 ± 0,6 |
| Parto por cesarea (%) | 48 | 36 |
| Edad gestacional (semanas), media±SD | 40 ± 2,3 | 40,5 ± 2,4 |
| Edad de la madre al dar a luz (años) media±SD | 30,6 ± 4,9 | 28,2 ± 5,4 |
| Lactancia materna (%) | | |
| No han dado el pecho | 74 | 73 |
| < 1 semana | 19 | 21 |
| 1-4 semanas | 8 | 6 |
| Fumadora durante el embarazo (%) | 22 | 15 |
| Fumadora durante la lactancia (%) | 27 | 16 |
| Fumadora en casa (%) | 52 | 48 |
| Hermanos (%) | 44 | 45 |
| Fueron a guardería antes de los 6 meses (%) | 11 | 3 |
| Peso de la madre (kg), media±SD | 72,7 ± 6,5 | 68,8 ± 5,7 |
| Historial familiar de alergias (%) | 32 | 23 |
| Mascotas en casa (%) | 30 | 33 |
| Vacuna Rotavirus | 68 | 69 |

1.2. Percentiles y z-scores del estudio.

A partir de la media, por género y grupo, de los pesos, talla y perímetro craneal de los niños a las 4 semanas de vida cuando se incluyen en el estudio, se representaron los percentiles correspondientes a lo largo del tiempo (Figura 2).

Las curvas muestran que el crecimiento en la talla es muy similar en ambos grupos. En el caso de las niñas al inicio del estudio se encuentran en el percentil 50 acabando el estudio entre los percentiles 50 y 75. Los varones inician el estudio en un percentil un poco por debajo del 50 finalizando entre el 50 y 75. Al finalizar el estudio se observa una ligera diferencia entre los grupos control y probiótico mostrando una mayor talla los niños que recibieron la fórmula probiótica. Esta diferencia es más patente en el caso de los niños y se analizará mediante la aplicación del modelo estadístico correspondiente (figura 2).

En cuanto al peso corporal no se observan diferencias entre ambos grupos. Al inicio del estudio tanto los niños como las niñas parten de un percentil 50 y al finalizar el estudio se encuentran entre el percentil 50 y 75 (figura 2). El comportamiento es muy similar para la medida de perímetro craneal (figura 2).

Se calcularon las puntuaciones Z de talla, peso y perímetro craneal por edad en base a los Estándares de Crecimiento Infantil de la OMS (WHO, 2006) (figura 3). Los valores antropométricos de los niños que participaron en el estudio no difirieron de la población estándar. El análisis estadístico de los datos no mostró diferencias entre grupos en el peso corporal ni en el perímetro craneal ($p=0.061$ y $p=0.453$ respectivamente). Sin embargo, los niños del grupo probiótico mostraron valores de talla ligeramente más altos que los niños del grupo control ($p=0.021$).

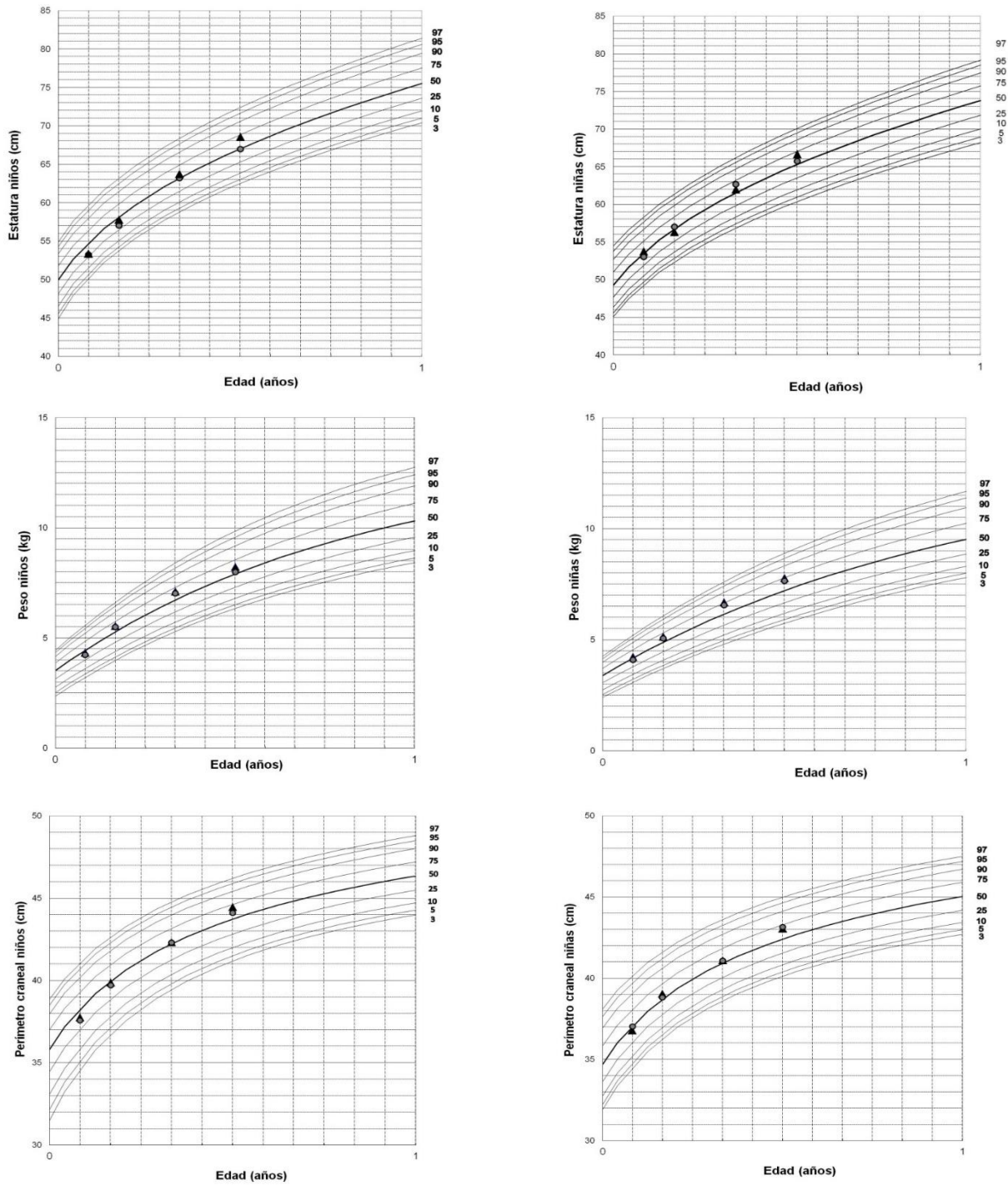


Figura 2. Percentiles de los niños del estudio con respecto al tiempo. Círculos grises representan al grupo control y triángulos negro al grupo probiótico. Las líneas negras representan los percentiles estándar correspondientes a cada edad.

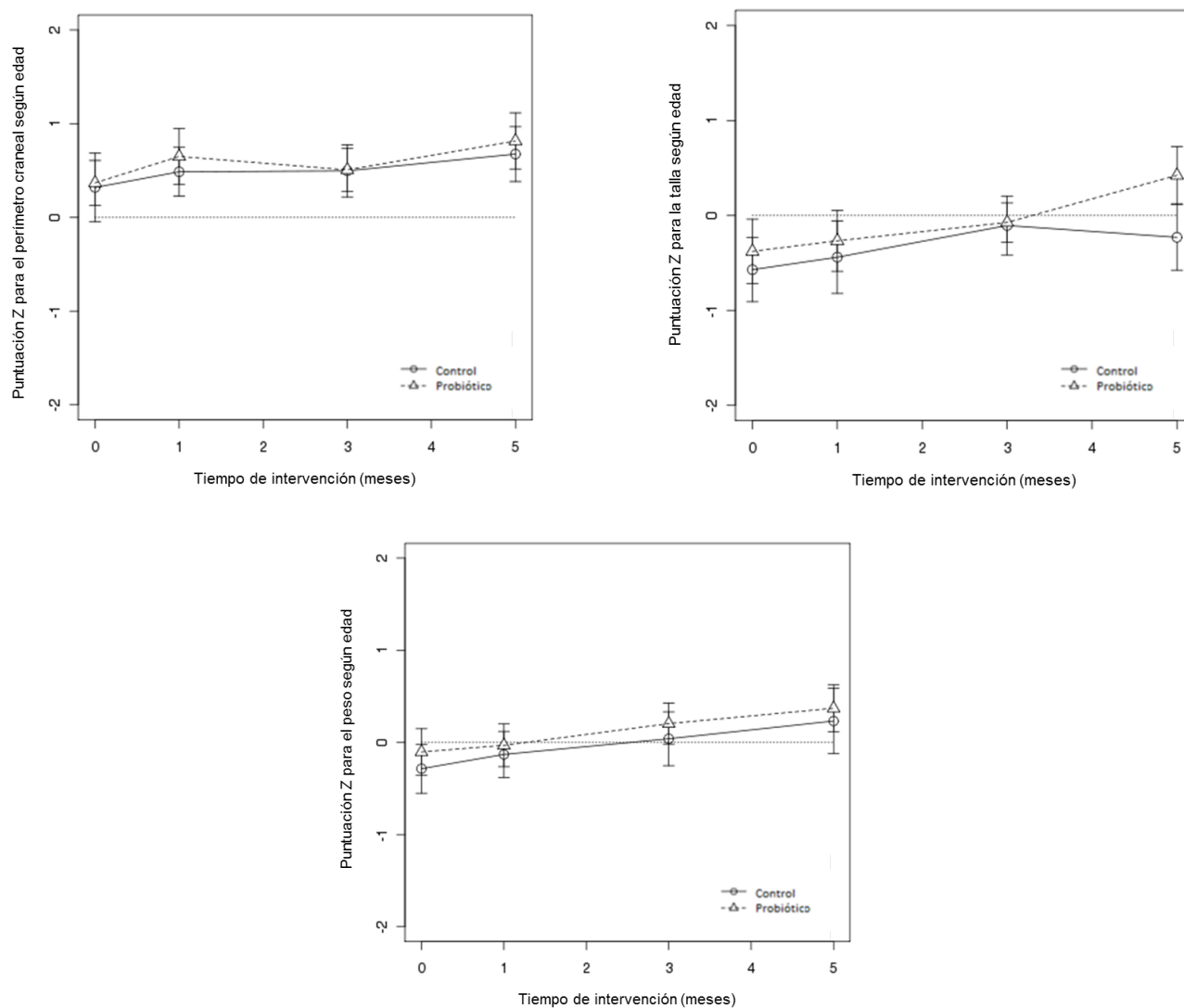


Figura 3. Puntuación Z para peso corporal, talla y perímetro craneal por edad (media y 95%CI).

1.3. Crecimiento.

En cuanto al peso, no se observaron diferencias significativas para el peso y el aumento de peso a los 4 meses de edad ni al final de la intervención (6 meses de edad). Se obtuvieron resultados similares para el perímetro craneal (tabla 2). En cuanto a la talla, al finalizar la intervención los niños que consumieron la fórmula probiótica mostraron valores de talla ligeramente superiores (una media de 1,5

cm más que el grupo control, $p=0,038$). Sin embargo, el aumento de la talla (cm/día) de los lactantes fue equivalente y no se observaron diferencias significativas (tabla 2).

Tabla 2. Parámetros antropométricos basales a 1, 4 y 6 meses.

| Parámetros de crecimiento | Grupo control | | | | Grupo probiótico | | | |
|---------------------------|---------------|----------|----------|---------------------------|------------------|----------|-----------------------|---------------------------|
| | 1 mes | 4 meses | 6 meses | Ganancia/día ^a | 1 mes | 4 meses | 6 meses | Ganancia/día ^a |
| Peso (kg) | 4,2±0,6 | 6,8±0,8 | 7,9±1,0 | 25,6±6,0 | 4,3±0,5 | 6,9± 0,7 | 8,0±0,9 | 24,8±5,1 |
| Talla (cm) | 53,1±2,6 | 62,8±3,5 | 66,6±2,5 | 0,90±0,2 | 53,6±2,1 | 63,0±1,8 | 68,1±3,4 ^a | 0,96±0,3 |
| Perímetro craneal (cm) | 37,4±1,6 | 42,1±2,7 | 43,7±1,3 | 0,421±0,1 | 37,3±1,1 | 41,1±4,7 | 43,7±1,6 | 0,43±0,1 |

La ganancia diaria corresponde a la diferencia entre los valores basales y a los 6 meses. ($p<0.05$ versus control). ^a

Peso: g/día ; Talla: mm/día ; P. craneal: mm/día

1.4. Ingesta de la fórmula, tolerancia y efectos adversos.

Ambas fórmulas de estudio fueron bien toleradas por los niños y por tanto el cumplimiento del protocolo en lo que a las tomas se refiere fue bueno. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio con respecto a la ingesta diaria de fórmula ($630,9 \pm 197,7$ ml/día en grupo control y $587,8 \pm 201,3$ ml/día en grupo probiótico). Teniendo en cuenta que la fórmula probiótica contenía 1×10^7 UFC/g, el consumo medio de bacteria fue de 8.4×10^8 UFC/día. Dos bebés en el grupo control y dos en el grupo experimental debieron de abandonar la intervención debido al reflujo gastroesofágico y tuvieron que cambiar a una fórmula infantil anti-reflujo, pero no hubo diferencias significativas en las tasas de abandonos entre los dos grupos.

No se observaron diferencias en parámetros relacionados con la función intestinal como son el número de deposiciones fecales diarias, las características de la materia fecal, flatulencias, regurgitación. Algunos aspectos del comportamiento del bebé se ven influenciados por la alimentación como por ejemplo el sueño, el nivel de actividad, el humor y el llanto. No se observó efecto de la fórmula probiótica sobre estos parámetros (Tabla 3). Por otra parte no se manifestaron efectos adversos relacionados al consumo de la fórmula probiótica.

Tabla 3. Parámetros relacionados con la función intestinal y el comportamiento influenciados por la alimentación.

| Tiempo | 1 mes | 4 meses | 6 meses |
|---|------------|------------|------------|
| Deposiciones/día^a | | | |
| G. control | 1,88 ± 0,6 | 1,84 ± 0,5 | 1,98 ± 0,2 |
| G. probiótico | 1,94 ± 0,6 | 1,80 ± 0,7 | 1,93 ± 0,4 |
| Color de heces^b | | | |
| G. control | 1,8 ± 0,8 | 2,10 ± 1,0 | 2,49 ± 0,8 |
| G. probiótico | 1,81 ± 0,7 | 2,07 ± 0,9 | 3,10 ± 1,3 |
| Consistencia^c | | | |
| G. control | 2,92 ± 0,6 | 3,08 ± 0,5 | 2,63 ± 0,6 |
| G. probiótico | 3,04 ± 0,4 | 2,98 ± 0,5 | 2,54 ± 0,7 |
| Flatulencia^d | | | |
| G. control | 1,74 ± 0,9 | 1,18 ± 0,4 | 1,12 ± 0,3 |
| G. probiótico | 1,64 ± 0,7 | 1,33 ± 0,8 | 1,20 ± 0,7 |
| Regurgitación^e | | | |
| G. control | 1,90 ± 0,8 | 1,78 ± 0,8 | 1,57 ± 0,7 |
| G. probiótico | 1,77 ± 0,7 | 1,89 ± 0,9 | 1,68 ± 1,0 |
| Horas de sueño^f | | | |
| G. control | 2,56 ± 0,8 | 3,14 ± 0,7 | 3,47 ± 0,7 |
| G. probiótico | 2,66 ± 1,0 | 3,44 ± 0,8 | 3,73 ± 0,8 |
| Horas de sueño totales^g | | | |
| G. control | 3,14 ± 0,9 | 2,84 ± 0,7 | 2,51 ± 0,9 |
| G. probiótico | 3,26 ± 0,7 | 2,82 ± 0,9 | 2,78 ± 1,0 |
| Temperamento^h | | | |
| G. control | 2,62 ± 0,7 | 2,44 ± 0,5 | 2,47 ± 0,5 |
| G. probiótico | 2,43 ± 0,6 | 2,40 ± 0,5 | 2,39 ± 0,5 |

1.5. Efectos sobre la salud de los niños.

Durante el periodo de intervención el 51% de los niños padeció infecciones respiratorias y el 16% de infecciones gastrointestinales. Del total de las enfermedades infecciosas que se registraron, la mayoría, un 76%, correspondieron a infecciones de las vías respiratorias (tabla 4). En cuanto a las infecciones gastrointestinales, el grupo probiótico mostró una reducción significativa del 71% en la tasa

de incidencia ($0,082 \pm 0,037$) en comparación con el grupo control ($0,283 \pm 0,068$) ($p=0,018$) (tabla 4). La razón de probabilidad de tener al menos una infección gastrointestinal fue de 0,36 (IC del 95%: 0,08 hasta 0,97) ($p=0,025$). En particular, la probabilidad de tener una aparición de infección gastrointestinal en el grupo probiótico fue casi 3 veces menor que en el grupo control.

No se encontraron diferencias en las tasas de incidencia de infecciones respiratorias entre ambos grupos, aunque ésta fue menor en el grupo probiótico que en el grupo control [tabla 4].

Tabla 4. Incidencia de enfermedades infecciosas, procesos febriles y tratamientos antibióticos durante la intervención.

| | Grupo Control | | Grupo Probiótico | | Tasa de incidencia (SE) | Disminución IR (%) | NNT | IRR | Valor-p |
|--------------------------------|---------------|-------------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|-----|-------|---------|
| | Nº eventos | Tasa de incidencia (SE) | Nº eventos | Tasa de incidencia (SE) | | | | | |
| Infecciones Gastrointestinales | 17 | 0,283 (0,07) | 5 | 0,080 (0,04) | 0,289 (0,085-0,831)* | 71,1 | 5 | 0,018 | |
| Infecciones Respiratorias | 43 | 0,716 (0,11) | 42 | 0,689 (0,11) | 0,977 (0,623-1,530) | 3,9 | 61 | 0,933 | |
| Infecciones totales | 63 | 1,050 (0,13) | 49 | 0,803 (0,11) | 0,778 (0,524-1,148) | 23,5 | 4 | 0,339 | |
| Episodios febriles | 13 | 0,220 (0,06) | 13 | 0,213 (0,06) | 0,967 (0,427-2,341) | 3,3 | - | - | |
| Tratamientos antibióticos | 7 | 0,115 (0,04) | 8 | 0,131 (0,05) | 1,105 (0,362-3,702) | -10,5 | -61 | 0,807 | |

* $p < 0,05$ vs control

En cuanto a otro tipo de infecciones se recogieron en los historiales de los niños un total de 5 episodios (3 en grupo control y 2 en grupo probiótico) correspondientes a candidiasis, infección urinaria, conjuntivitis, varicela u otitis. La tasa de incidencia de infecciones totales fue menor en el grupo probiótico pero esta diferencia no fue significativa. No se observaron tampoco diferencias significativas en la incidencia de episodios febriles ni en la frecuencia de tratamientos con antibióticos (Tabla 4).

1.6. Parámetros fecales.

La media observada de los recuentos fecales de Lactobacilos, Bifidobacterias, Clostridios y Bacteroides en cada tiempo entre ambos grupos fue similar, aunque se observó un aumento significativo de estos grupos de bacterias con el tiempo (tabla 5).

La cepa *L. fermentum* CECT5716 fue detectada viable en las muestras de heces del 53% de los recién nacidos del grupo probiótico. En el grupo control sólo se detectó la cepa en 2 niños (3,3%).

La capacidad de la microbiota fecal de los lactantes para producir ácidos grasos de cadena corta (butírico, propiónico y acético) y la concentración de IgA en las heces fue similar en ambos grupos (Tabla 5).

Tabla 5. Recuento bacteriano en muestras fecales (logaritmo de ufc/g), concentración fecal de ácidos grasos de cadena (AGGC, mg/g de heces) e IgA (mg/g de heces) al inicio del estudio (1 mes de edad) , 4 y 6 meses de edad.

| | Grupo control | | | Grupo probiótico | | |
|--------------------------|---------------|------------|------------|------------------|------------|-------------|
| | 1 mes | 4 meses | 6 meses | 1 mes | 4 meses | 6 meses |
| Grupo bacteriano | | | | | | |
| Lactobacillus spp. | 6,99 ± 0,2 | 7,35 ± 0,2 | 7,80 ± 0,2 | 6,79 ± 0,2 | 7,05 ± 0,2 | 7,88 ± 0,2 |
| Bifidobacterium spp. | 6,70 ± 0,2 | 7,18 ± 0,1 | 7,81 ± 0,2 | 6,65 ± 0,2 | 6,90 ± 0,2 | 7,83 ± 0,2 |
| Clostridium spp. | 6,80 ± 0,2 | 6,98 ± 0,1 | 7,43 ± 0,2 | 6,48 ± 0,2 | 6,81 ± 0,2 | 7,66 ± 0,2 |
| Bacteroides spp. | 6,66 ± 0,2 | 6,94 ± 0,1 | 7,52 ± 0,2 | 6,38 ± 0,2 | 6,84 ± 0,2 | 7,57 ± 0,2 |
| AGCC | | | | | | |
| Acetato | 14,5 ± 1,1 | 13,4 ± 1,5 | 12,4 ± 1,1 | 12,8 ± 1,1 | 11,5 ± 0,9 | 14,4 ± 1,4 |
| Propionato | 2,75 ± 0,5 | 2,15 ± 0,2 | 2,71 ± 0,3 | 2,27 ± 0,2 | 1,89 ± 0,1 | 3,08 ± 0,5 |
| Butirato | 2,31 ± 0,5 | 2,32 ± 0,4 | 2,38 ± 0,3 | 1,60 ± 0,3 | 1,73 ± 0,2 | 2,94 ± 0,4 |
| Inmonoglobulina A | 1,16 ± 1,12 | 1,19 ± 0,9 | 0,89 ± 0,8 | 1,13 ± 1,0 | 1,09 ± 1,0 | 0,998 ± 1,0 |

2.- SEGURIDAD A LARGO PLAZO DEL CONSUMO PRECOZ DE LACTOBACILLUS FERMENTUM CECT5716: SEGUIMIENTO A LOS TRES AÑOS DE EDAD.

2.1 Población.

A las familias de los niños que concluyeron el estudio desarrollado en el punto anterior (Gil-Campos y col, 2012) se les invitó a participar en un estudio de seguimiento del crecimiento y salud del niño a los 3 años de edad del niño. De los 121 niños que concluyeron la intervención 5 padres no pudieron ser localizados y 6 padres no aceptaron participar por lo que se incluyeron 110 niños en el estudio de seguimiento. Durante el seguimiento hubo 9 bajas en el grupo control y 10 en el grupo probiótico debido a que no acudieron a las visitas para la recogida de los datos del niño. Finalmente, 91 niños, 46 del grupo control y 45 del grupo probiótico, concluyeron el seguimiento y fueron analizados (figura 4).

Las características basales de los 91 niños que participaron en el estudio de seguimiento fueron similares en ambos grupos (Tabla 6). Todos los niños recibieron las mismas vacunas obligatorias según el calendario español de las vacunas. El porcentaje de niños que revieron vacunas opcionales en España frente a rotavirus, influenza, varicela o neumonía por Streptococcus fue también similar en ambos grupos (Tabla 6).

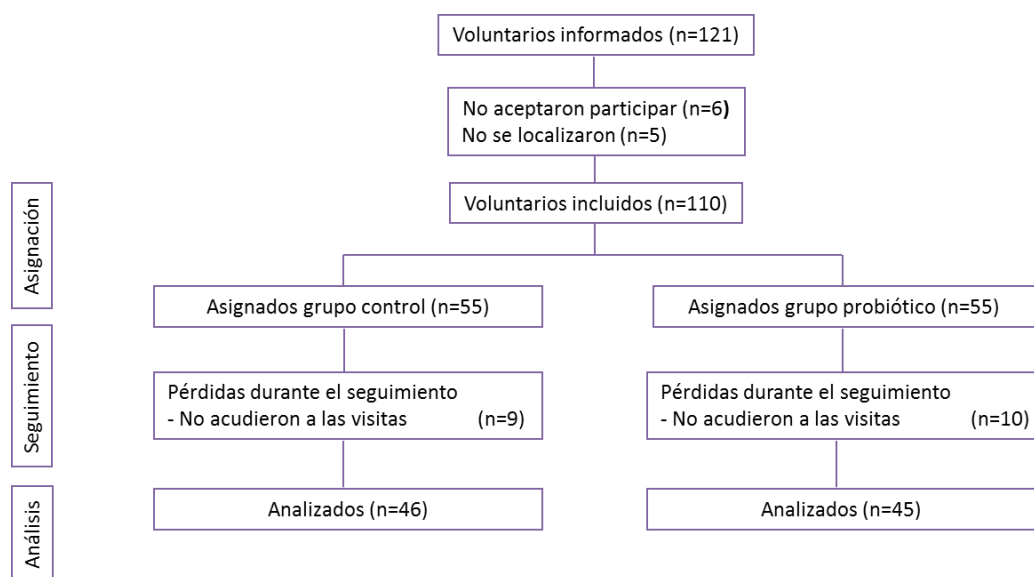


Figura 4. Diagrama de flujo de participantes.

Tabla 6. Características basales de los sujetos que participaron en el estudio.

| | Control (n=46) | Probiótico (n=45) | <i>p-valor</i> |
|---|--------------------------|-----------------------------|----------------|
| Niño/niña, n (%) | 29/17 (63/37) | 26/19 (58/42) | 0,608 |
| Edad a T3 (años), media±SD | 3,02±0,1 | 3,02±0,1 | 0,236 |
| Parto por cesarea (%) | 52,2 | 35,6 | 0,110 |
| Edad gestacional (semanas) media±SD | 40,0±2,3 | 40,5±2,4 | 0,176 |
| Lactancia materna antes de 1 mes (%) | 36,4 | 26,7 | 0,165 |
| Padre fumador (%) | 54,3 | 40,0 | 0,170 |
| Madre fumadora (%) | 36,9 | 31,1 | 0,556 |
| Hermanos (%) | 69,6 | 66,7 | 0,974 |
| Edad (meses) en que acudió a la guardería, media±SD | 17,3±5,0 | 19,6±10,9 | 0,303 |
| Historial familiar de alergias (%) | 54,3 | 62,2 | 0,446 |
| Mascotas en casa (%) | 28,3 | 31,1 | 0,384 |
| Vacuna de rotavirus (%) | 60,9 | 68,9 | 0,423 |
| Vacuna Streptococcus pneumoniae (%) | 45,7 | 44,4 | 0,908 |
| Vacuna del Influenza (%) | 8,7 | 6,7 | 0,512 |
| Vacuna de Varicela (%) | 19,6 | 20,0 | 0,958 |

2.2 Percentiles y crecimiento de los niños.

A partir de la media, por género y grupo, de los pesos, talla y perímetro craneal de los niños se representaron los percentiles correspondientes a lo largo del tiempo con respecto a las curvas estándar publicadas por la OMS (referencia WHO que ya se mencionó en el estudio p020) (Figura 2). A tiempo final del seguimiento, correspondiente a los 3 años de edad del niño, la media de peso estaba en torno al percentil 75 y la media de talla entre el percentil 50 y 75 (figura 5), no observándose diferencias entre ambos grupos. Respecto al perímetro craneal, la media a fin del estudio estuvo entre el percentil 75 y 90 en el caso de los niños, y en torno al 90% en el caso de las niñas. No se observaron diferencias entre

ambos grupos aunque hay que señalar que el dato de perímetro craneal no se recogió para todos los niños y sólo se obtuvieron datos de 59 niños (figura 6).

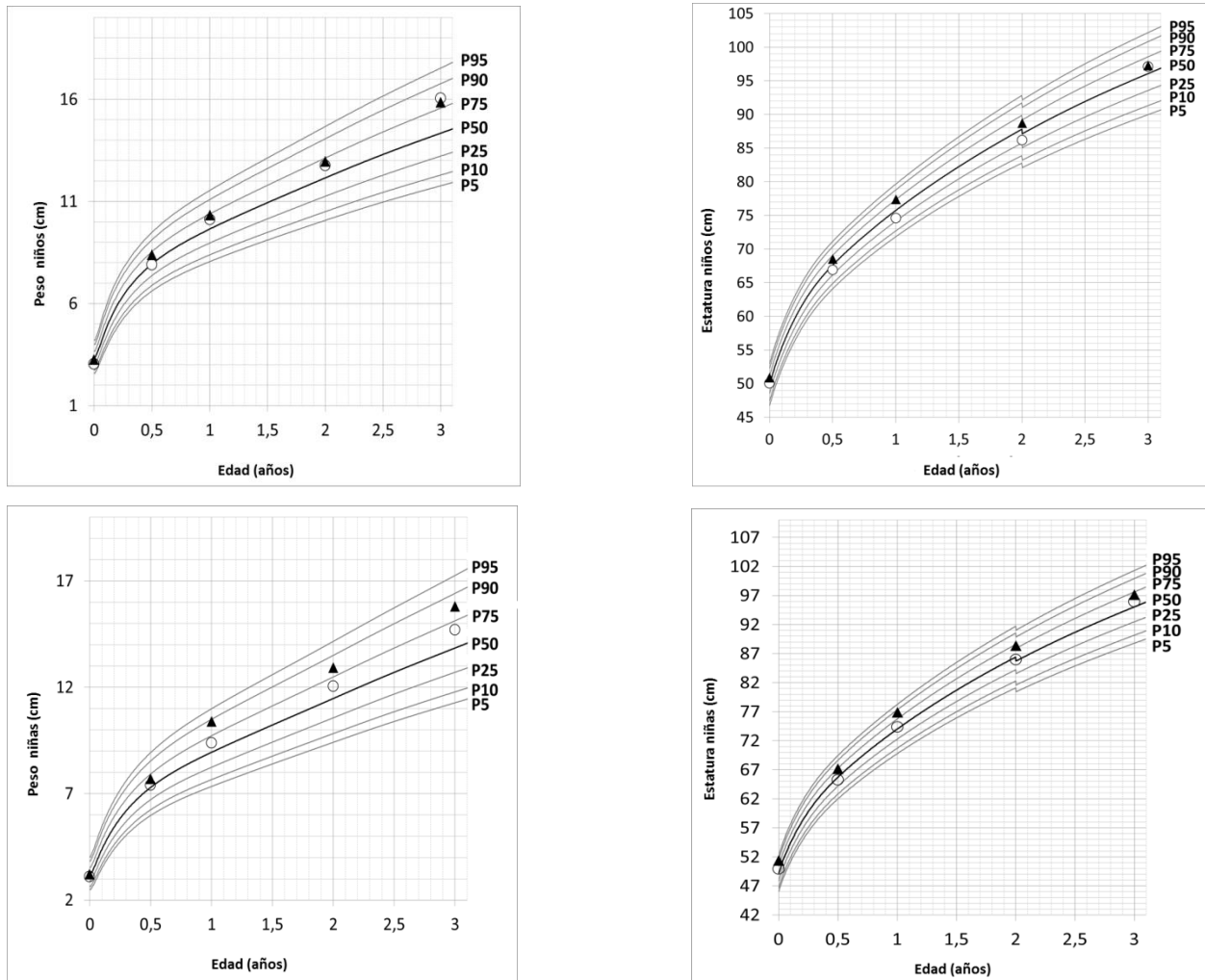


Figura 5. Percentiles de peso y talla de niños y niñas incluidas en el estudio.

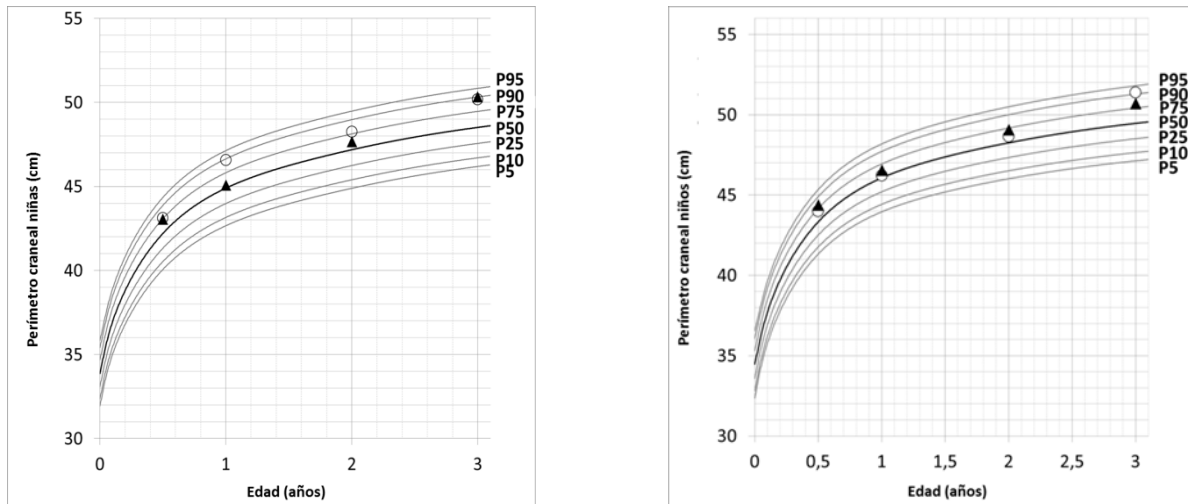


Figura 6. Percentiles de perímetro craneal de niños y niñas incluidos en el estudio.

La puntuación Z para el peso, talla y perímetro craneal por edad se calcularon basándose en los patrones de crecimiento infantil de la OMS (referencia WHO). Los valores antropométricos de los niños que participaron en el estudio no difirieron de la población estándar y no se detectaron diferencias significativas entre los grupos de estudio a los tres años (figura 7). La mayor talla que se observó en el grupo probiótico al finalizar el estudio de intervención a los 6 meses de edad se mantiene hasta los 2 años de edad, sin embargo, a los 3 años de edad ya no se observan estas diferencias y la talla en ambos grupos es similar. Se calculó también la puntuación Z para el índice de masa corporal no observándose diferencias significativas entre ambos grupos.

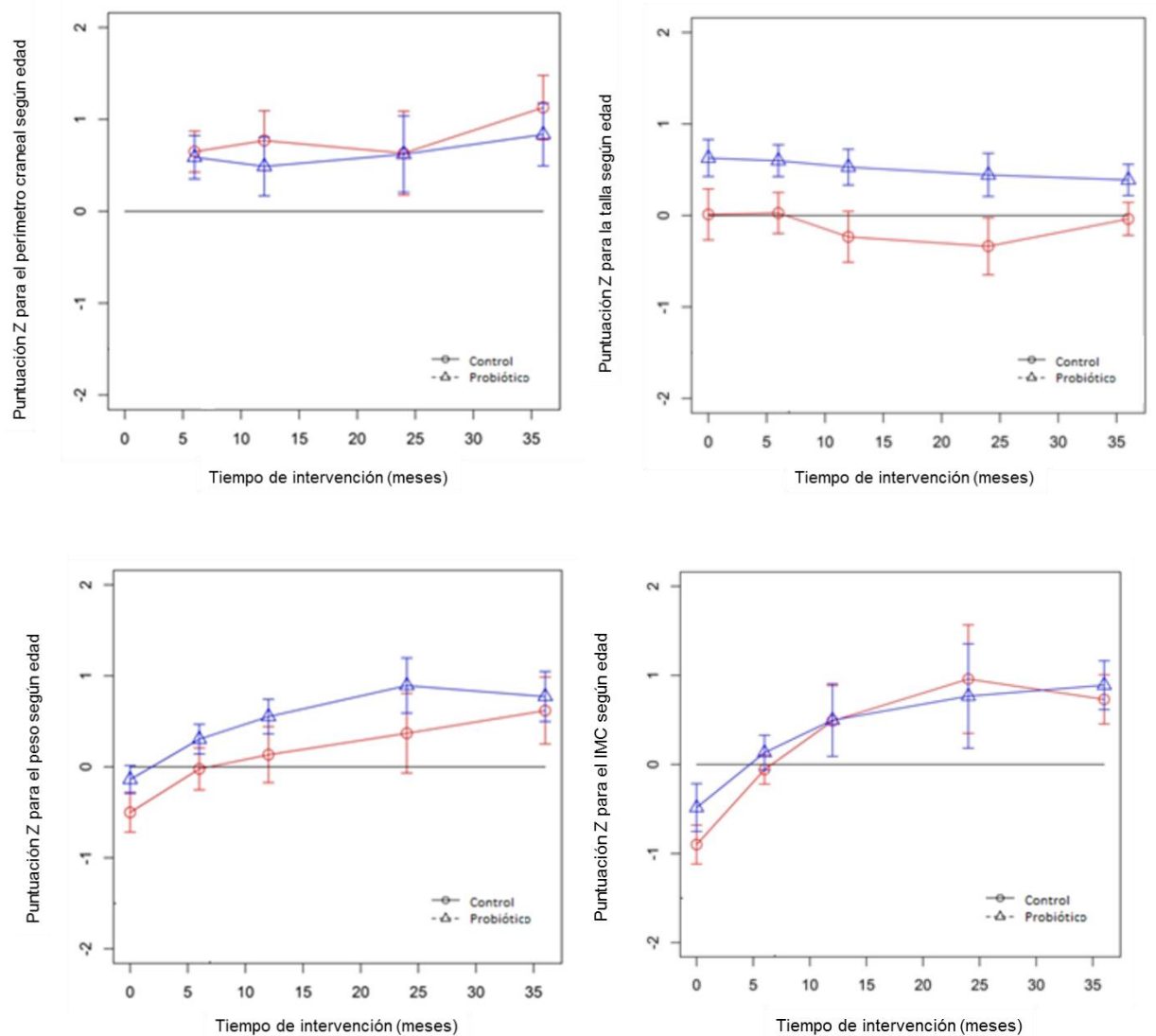


Figura 7. Puntuación Z para peso corporal, talla y perímetro craneal por edad (media y 95%CI).

La media de las medidas antropométricas en el grupo control y el grupo probiótico se muestran en la tabla 7. A los 3 años de medidas de peso, talla y perímetro craneal fueron similares en ambos grupos. Al igual que se observó en el análisis de la puntuación Z, la comparación de las tallas de los niños a lo largo del tiempo mostró mayores valores en el grupo probiótico entre los 6 meses y los dos años de edad años ($p=0,003$, $p=0,011$ y $p=0,034$, respectivamente). Los análisis de interacciones mostraron que tanto los eventos de infecciones respiratorias durante el primer mes de vida como el hábito de fumar de la madre, tuvieron un impacto negativo significativo en cuanto a la talla de los niños se refiere ($p=0,025$ y $p=0,027$, respectivamente).

Tabla 7. Las medidas antropométricas al nacer, 0.5, 1, 2 y 3 años de edad.

| Parámetros de crecimiento | Grupo control | | | | | Grupo probiótico | | | | |
|-------------------------------|---------------|----------|----------|----------|----------|------------------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 mes | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 1 mes | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años |
| Peso (kg) | 4,1±0,6 | 7,7±1,0 | 9,7±1,7 | 12,3±1,8 | 15,5±2,6 | 4,4±0,5 | 8,1±0,9 | 10,3±1,9 | 13,0±2,2 | 15,8±2,1 |
| Altura (cm) | 52,9±2,6 | 66,3±2,4 | 74,5±4,1 | 86,1±3,2 | 96,7±4,7 | 53,6±2,0 | 67,9±2,6 | 77,2±3,7 | 88,6±4,1 | 97,2±4,1 |
| Perímetro craneal (cm) | 37,3±1,7 | 43,7±1,2 | 46,4±1,4 | 48,5±1,1 | 50,8±2,0 | 37,3±1,2 | 43,8±1,7 | 46,0±1,8 | 48,7±1,7 | 50,5±2,4 |

Los valores son medias \pm SEM. *, $p < 0,05$ vs control

2.3 Salud de los niños.

Se recopilaron los datos sobre la incidencia de enfermedades infecciosas durante los últimos 12 meses del seguimiento (T2 y T3) (tabla 8). En cuanto a las infecciones gastrointestinales el 30,1% de los niños presentaron episodios de diarrea en los últimos 12 meses. La mayoría de ellos sufrieron un solo evento (64,0%), siendo la duración media de los episodios de diarrea $3,98 \pm 4,00$ días. No se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos en la tasa de incidencia de infecciones gastrointestinales ($p=0,947$) ni en la duración de los episodios de diarrea ($p=0,599$).

En cuanto a las infecciones respiratorias, el 45,8% de los niños sufrió al menos un acontecimiento infección respiratoria. Se observaron infecciones en el tracto respiratorio superior en 65,3% de los eventos y 34,7% de los eventos fueron en el tracto respiratorio inferior. La duración media del cuadro infeccioso fue de $5,8 \pm 2,85$ días. La tasa de incidencia de las infecciones respiratorias y la duración de los episodios fueron similares en ambos grupos. No se detectaron diferencias significativas en la incidencia de otras enfermedades infecciosas utilizando un modelo de regresión de Poisson (tabla 8).

Tabla 8. La incidencia de enfermedades infecciosas durante los últimos 12 meses del estudio de seguimiento.

| | Grupo Control | | | Grupo experimental | | | | p-value IRR | |
|---|---------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|-------|----------------|-------|
| | Eventos | IR | SE | Eventos | IR | SE | IRR | | |
| Infecciones Gastrointestinales | 22 | 0,500 | 0,107 | 20 | 0,513 | 0,115 | 1,026 | 1,362 | 0,947 |
| Infecciones Respiratorios | 55 | 1,250 | 0,169 | 49 | 1,256 | 0,179 | 1,005 | 1,217 | 0,986 |
| Otitis | 19 | 0,463 | 0,106 | 16 | 0,421 | 0,105 | 0,909 | 1,404 | 0,814 |
| Otras enfermedades infecciosas^a | 8 | 0,174 | 0,061 | 5 | 0,111 | 0,050 | 0,639 | 1,768 | 0,458 |

^a conjuntivitis, escarlatina, varicela, infección urinaria.

En cuanto a las enfermedades alérgicas, 18 niños del grupo control sufrieron alergias, mientras que tan sólo las tuvieron 8 niños del grupo probiótico. El análisis estadístico mostró sin embargo que dicha diferencia no alcanza a ser estadísticamente significativa ($p=0,084$).

Con respecto a otras enfermedades no infecciosas, en el grupo de control un niño presentó una atrofia renal y litiasis vesical que precisó de intervención quirúrgica, otro generó intolerancia a la lactosa y otro voluntario fue diagnosticado de psoriasis. En el grupo experimental, tan sólo un niño sufrió de migrañas. Las hospitalizaciones e intervenciones quirúrgicas se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Hospitalizaciones y procedimientos quirúrgicos durante el período de estudio.

| | Grupo control | | Grupo probiótico | | p-valor |
|--------------------------|-----------------------|-------|---------------------------|-------|---------|
| | Eventos | IR | Eventos | IR | |
| Hospitalizaciones | 5 | 0.10 | 9 | 0.20 | 0,973 |
| | <i>2 bronquitis</i> | | <i>1 amígdalas</i> | | |
| | <i>1 cistolitomía</i> | | <i>1 Bronquitis</i> | | |
| | <i>1 relux</i> | | <i>3 infecciones</i> | | |
| | <i>1 adenoides</i> | | <i>gastrointestinales</i> | | |
| | | | <i>2 Migrañas</i> | | |
| | | | <i>1 fiebre alta</i> | | |
| | | | <i>1 intervención</i> | | |
| | | | <i>quirúrgica por</i> | | |
| | | | <i>ingestión de</i> | | |
| | | | <i>monedas</i> | | |
| Intervenciones | 4 | 0,086 | 4 | 0,088 | 0,495* |
| Quirúrgicas | | | <i>1 amígdalas</i> | | |
| | | | <i>1 hipertrofia de</i> | | |
| | | | <i>píloro</i> | | |
| | <i>2 Hydrocele</i> | | <i>1 lagrimal</i> | | |
| | <i>1 adenoides</i> | | <i>obstruido</i> | | |
| | <i>1 cistolitomía</i> | | <i>1 intervención</i> | | |
| | | | <i>quirúrgica por</i> | | |
| | | | <i>ingestión de</i> | | |
| | | | <i>monedas</i> | | |
| *Prueba de Fisher | | | | | |

3.4 Función intestinal.

Las deposiciones fecales/semana, el color habitual de las heces, la consistencia fecal y la frecuencia habitual de padecer la flatulencia o dolor de vientre se registraron como parámetros relacionados con la función intestinal (tabla 10). Con respecto al tránsito intestinal, el 72,6% de los niños tuvieron una frecuencia de una o dos deposiciones por día y el 22% tienen de 4 a 6 deposiciones por semana. No se observaron diferencias significativas entre los grupos. No se observaron diferencias en el

color o consistencia de las heces. En cuanto a síntomas intestinales relacionados con la función intestinal la frecuencia de presentar malestar intestinal, flatulencia o dolor de estómago en los niños fue similar en ambos grupos.

Tabla 10. Parámetros relacionados con la función intestinal de los niños a los 3 años de edad.

| Frecuencia | G. Control | | G. probiótico | | p-value |
|-------------------------------------|------------|------|---------------|------|---------|
| | N | % | N | % | |
| 1 - 3 veces por semana | 0 | 0,00 | 3 | 6,7 | 0,463* |
| 4 - 6 veces por semana | 9 | 1,6 | 11 | 24,4 | |
| 1 vez al día | 19 | 41,3 | 17 | 37,8 | |
| 2 veces al día | 17 | 37,0 | 13 | 28,9 | |
| 3 o más veces al día | 1 | 2,2 | 1 | 2,2 | |
| Color de heces | N | % | N | % | 0,492* |
| Amarilo | 0 | 0,0 | 0 | 0,00 | |
| Amarillo - verde - marrón (mostaza) | 1 | 2,2 | 2 | 4,4 | |
| Marrón | 45 | 97,8 | 43 | 95,6 | |
| Gris | 0 | 0,0 | 0 | 0,00 | |
| Verde | 0 | 0,0 | 0 | 0,00 | |
| Consistencia | N | % | N | % | 0,492 |
| Muy dura (pequeñas bolitas) | 6 | 13,0 | 6 | 13,3 | |
| Dura (pasta) | 33 | 71,7 | 34 | 75,6 | |
| Blanda (pasta) | 7 | 15,2 | 5 | 11,1 | |
| Muy blanda (casi líquida) | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | |
| Líquida | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | |

*Prueba de Fisher

Tabla 10 (continuación). Parámetros relacionados con la función intestinal de los niños a los 3 años de edad.

| Flatulencias | N | % | N | % | |
|--------------------------------------|----------|----------|----------|----------|--------|
| Nunca | 23 | 50,0 | 20 | 44,4 | 0,242* |
| Raramente | 8 | 17,4 | 13 | 28,9 | |
| A veces | 11 | 23,9 | 12 | 26,7 | |
| A menudo | 2 | 4,3 | 0 | 0,0 | |
| Muy a menudo | 2 | 4,3 | 0 | 0,0 | |
| Queja de dolor de barriga | N | % | N | % | |
| Nunca | 17 | 37,0 | 17 | 37,8 | 0,421* |
| Raramente | 18 | 39,1 | 15 | 33,3 | |
| A veces | 9 | 19,6 | 13 | 28,9 | |
| A menudo | 2 | 4,3 | 0 | 0,0 | |
| Muy a menudo | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | |

*Prueba de Fisher

3.6 Parámetros fecales.

No se observaron diferencias en la media de los recuentos fecales de Lactobacilos, Bifidobacterias, Clostridios y Bacteroides ni en la capacidad de la microbiota fecal de los niños para producir ácidos grasos de cadena corta (butírico, propiónico y acético) (tabla 6). Se detectaron Bifidobacterias en el 100% de los niños, sin embargo los niveles de Lactobacillus estaban por debajo del límite de detección (<10.000 ufc/g) en el 34,8% de los niños del grupo de control y un 24% del grupo experimental.

La concentración de IgA fecal se analizó en las muestras fecales no observándose diferencias significativas (tabla 11).

Tabla 11. Contaje de bacterias en muestras fecales (logaritmo de ufc/g), concentración fecal de ácidos grasos de cadena (AGGC, mg/g de heces) e IgA (mg/g de heces) a los 3 años de edad. Los valores se muestran como medias \pm desviación estándar.

| | Grupo Control | Grupo probiótico | p-value |
|-----------------------------|----------------|------------------|---------|
| Grupo bacteriano | | | |
| <i>Lactobacillus spp.</i> | 5,88 \pm 0,7 | 5,88 \pm 0,7 | 0,974 |
| <i>Bifidobacterium spp.</i> | 9,12 \pm 0,7 | 8,90 \pm 0,9 | 0,178 |
| <i>Clostridium spp.</i> | 6,64 \pm 0,7 | 6,52 \pm 0,7 | 0,473 |
| <i>Bacteroides spp.</i> | 8,37 \pm 0,7 | 8,41 \pm 0,8 | 0,784 |
| SCFA | | | |
| <i>Acetate</i> | 6,85 \pm 2,6 | 7,22 \pm 2,6 | 0,504 |
| <i>Propionate</i> | 2,72 \pm 1,6 | 2,92 \pm 1,6 | 0,561 |
| <i>Butyrate</i> | 2,02 \pm 0,8 | 2,20 \pm 1,2 | 0,423 |
| Immunoglobulina A | | | |
| | 4,77 \pm 3,5 | 4,82 \pm 1,0 | 0,834 |

3.- *Lactobacillus fermentum* CECT5716 EN MADRES LACTANTES QUE SUFREN DOLOR DE PECHO

3.1 Población

Se informó a un total de 200 mujeres sobre el estudio de las cuales 148 mujeres fueron incluidas en el estudio tras acceder a participar en el estudio y comprobar que cumplían los criterios de inclusión establecidos. Las mujeres fueron asignadas de forma aleatoria a cada uno de los grupos de intervención. Finalmente recibieron el tratamiento 113 mujeres (30 en el grupo control [en adelante GC], 26 en grupo probiótico I [en adelante GP I], 27 en el grupo probiótico II [en adelante GP II] y 30 en el grupo probiótico III [en adelante GP III]). Posteriormente, tras el análisis de la carga bacteriana en leche, se descartó a todas aquellas mujeres que partían de una concentración inferior a 10^3 CFU/ml de leche al no cumplir el requisito de inclusión en el estudio. Durante la intervención 17 mujeres interrumpieron el tratamiento debido a: tratamiento con antibióticos para la mastitis (1 en el GC, 2 en el GP I, 2 en el GP II y 2 en el GP III), propia percepción de falta de mejoría (2 en el GC, 2 en GP I y 1 en GP II), tratamiento antibiótico para la amigdalitis (1 en el GP II), no asistencia a las visitas establecidas (1 en el GC, 1 en el GP I y 2 en el GP III). Los datos para estas mujeres se incluyeron en el análisis. Por lo tanto, los datos de 98 mujeres fueron incluidos en el análisis (27 en el GC, 23 en el GP I, 24 en el GP II y 24 en el GP III). Un diagrama de flujo de los participantes en el estudio se presenta en la figura 8.

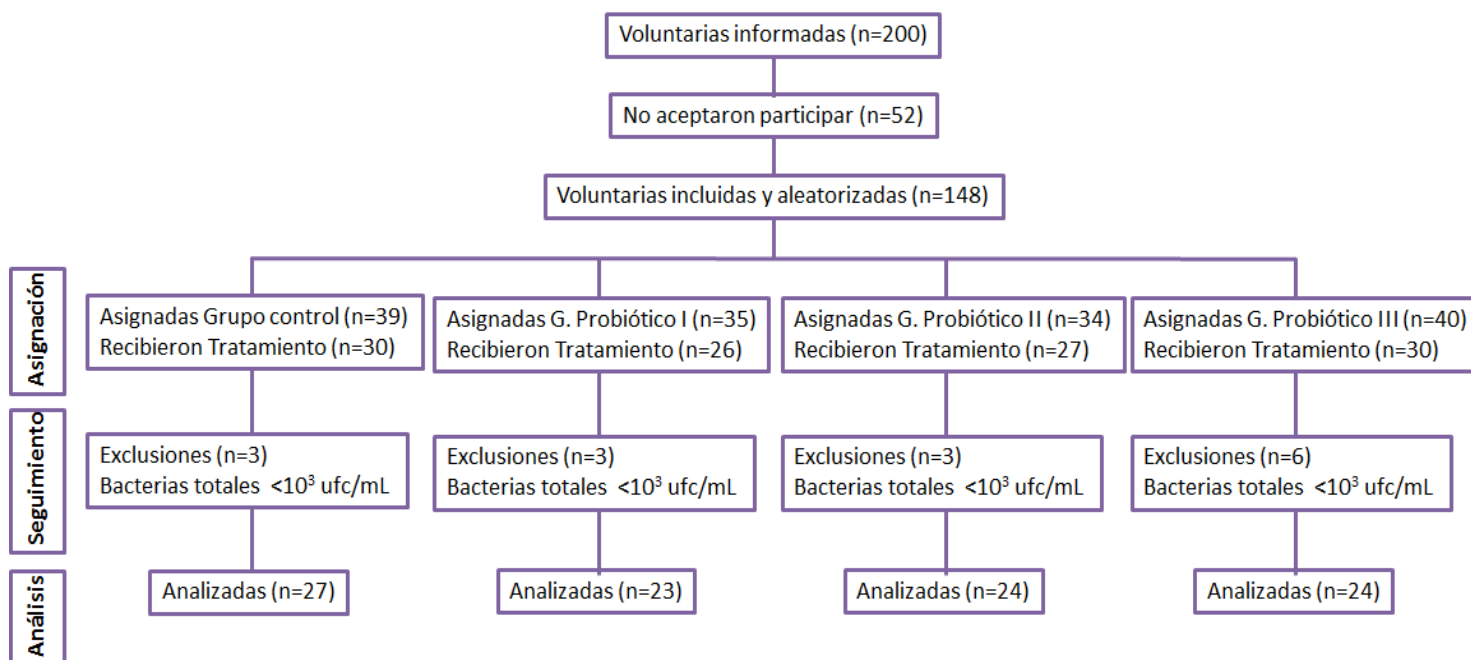


Figura 8. Diagrama de flujo de participantes.

Las características basales de las mujeres de todos los grupos fueron similares a excepción del tiempo de la lactancia que fue significativamente menor en el grupo probiótico GP I (tabla 12). Se pidió a los participantes que rellenar un cuestionario sobre su dieta durante el período de estudio. En general, no se observaron diferencias significativas en las dietas de las mujeres entre los grupos de estudio o entre el inicio y el final de la intervención. Por lo tanto los efectos significativos observados en los diferentes parámetros de respuesta no pueden ser atribuidos a diferentes hábitos dietéticos de los participantes.

Tabla 12. Características basales de las voluntarias del estudio.

| | GC | GP I | GP II | GP III | Valor - p |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Edad de la madre (años)# | 33,4 ± 4,5 | 33,3 ± 5,2 | 34,3 ± 4,3 | 36,0 ± 2,8 | 0,102 ^a |
| Sección-C (%) | 32 | 25 | 12,5 | 20,8 | 0,443 ^b |
| Hijos anteriores (%) | 41,7 | 57,1 | 37,5 | 25 | 0,231 ^b |
| Casos de mastitis previos (%) | 38,5 | 21,7 | 8,3 | 16,7 | 0,063 ^b |
| Tiempo de Lactancia materna (días)* | 93,1 (56,3-137,7) | 54 (27,7-87,8) | 109,2 (74,0-155,9) | 106,2 (59,2-175,7) | 0,007 ^c |
| Lactancia materna mixta (%) | 23,1 | 21,7 | 25 | 25 | 1,000 ^b |
| Días con síntomas de dolor (días)* | 56,6 (23,8-99,4) | 36,2 (9,4-75,7) | 46,2 (23,1-71,9) | 84,7 (30,8-158,7) | 0,305 ^c |
| Tratamiento antibiótico previo (%) | 4,2 | 10,5 | 4,5 | 4,8 | 0,806 ^b |
| Grietas en los pezones (%) | 28 | 47,8 | 54,2 | 29,2 | 0,159 ^b |

a= anova b= test chi squared c= test Kruskal-Wallis # = ± desviación estándar * = (intervalo de confianza)

3.2 Contaje de bacterias

El principal objetivo del estudio fue evaluar el efecto del consumo de la cepa probiótica sobre la carga bacteriana en la leche. Al final de la intervención, se observó una disminución significativa en la carga bacteriana, que se calcula como 0.764, en EGI en comparación con el grupo de control y con respecto al punto inicial del estudio (p=0,011). Es interesante resaltar la interacción entre los días de la lactancia materna y la carga de bacterias; un mayor tiempo de lactancia aumenta se relaciona con una

menor carga bacteriana ($p=0,027$). Además, la concentración de IL-8 en leche también resulta estar estrechamente relacionada con la carga bacteriana en leche, aumentando a medida que se incrementa el número de bacterias en leche ($p=0,000$).

El grupo bacteriano más afectado por el tratamiento probiótico fue *Staphylococcus*. Mientras que en el grupo control la concentración de este microorganismo se mantuvo constante a lo largo del tiempo, el tratamiento probiótico redujo de forma significativa los niveles de *Staphylococcus* ($p=0,045$) (tabla 2). El valor medio estimado de reducción fue de -1,387 para GP I, -1,736 para el GP II y ligeramente inferior para el GP III (-0.589). Los valores más altos de IL-8 se asociaron significativamente con mayores cargas de *Staphylococcus* ($p=0,029$). Se detectó una interacción de la presencia de grietas en los pezones con la carga de *Staphylococcus* en los grupos GP I y GP II. En estos grupos, la reducción de la carga de *Staphylococcus* fue mayor entre las mujeres sin grietas en el pezón que entre las mujeres con grietas del pezón ($p=0,017$ para el GP I y $p=0,039$ para el GP II). Esta interacción también se observó en el GP III, aunque no alcanzó significación estadística ($p=0,191$).

Con respecto a la carga de *Streptococcus* en la leche materna, aunque se observaron cargas más bajas en promedio para las mujeres que tomaban el probiótico (en cualquiera de los 3 grupos) en comparación con el grupo de control, las diferencias fueron estadísticamente significativas sólo para el GP II ($p=0,044$) (Tabla 13). Al igual que se observó para *Staphylococcus*, niveles altos de IL-8 se correlacionaron significativamente con mayores cargas de *Streptococcus* ($p=0,007$).

En cuanto a la carga de *Lactobacillus* en leche, no se detectaron cambios significativos ni a lo largo del tiempo ni entre grupos.

Tabla 13. Contaje de bacterias (log 10 ufc/mL leche).

| Bacterias Totales | G. control | G. probiótico I | G. probiótico II | G. probiótico III |
|-----------------------|-------------|-----------------|------------------|-------------------|
| tiempo 0 | 4,41 ± 0,93 | 4,55 ± 1,32 | 4,31 ± 0,75 | 4,39 ± 1,02 |
| 7 días | 4,65 ± 0,94 | 4,37 ± 0,88 | 4,15 ± 0,88 | 4,53 ± 1,20 |
| 14 días | 4,61 ± 1,10 | 4,58 ± 0,97 | 4,38 ± 0,97 | 4,62 ± 1,11 |
| 21 días | 4,66 ± 0,99 | 4,18 ± 0,73*# | 4,36 ± 0,93 | 4,33 ± 1,15 |
| Staphylococcus | | | | |
| tiempo 0 | 3,61 ± 1,06 | 3,85 ± 1,63 | 3,70 ± 0,89 | 3,61 ± 1,07 |
| 7 días | 3,71 ± 1,44 | 3,23 ± 1,33 | 3,17 ± 1,32 | 3,66 ± 1,17 |
| 14 días | 3,83 ± 1,40 | 3,58 ± 1,20 | 3,21 ± 1,11 | 3,41 ± 1,40 |
| 21 días | 3,60 ± 1,14 | 3,33 ± 1,18*# | 2,93 ± 1,31*# | 3,15 ± 0,54* |
| Streptococcus | | | | |
| tiempo 0 | 3,12 ± 0,99 | 3,38 ± 0,93 | 2,99 ± 0,69 | 3,08 ± 0,96 |
| 7 días | 2,91 ± 0,86 | 3,34 ± 0,92 | 3,39 ± 0,76 | 3,20 ± 0,78 |
| 14 días | 3,31 ± 0,86 | 3,51 ± 1,09 | 3,17 ± 0,89 | 3,03 ± 0,82 |
| 21 días | 3,29 ± 0,76 | 3,33 ± 0,55 | 3,04 ± 0,93# | 3,15 ± 0,74 |
| Lactobacillus | | | | |
| tiempo 0 | 2,11 ± 0,51 | 1,96 ± 0,19 | 1,95 ± 0,37 | 2,05 ± 0,30 |
| 7 días | 2,30 ± 0,37 | 2,10 ± 0,38 | 1,97 ± 0,47 | 2,19 ± 0,42 |
| 14 días | 2,19 ± 0,34 | 2,12 ± 0,41 | 1,86 ± 0,45 | 2,03 ± 0,35 |
| 21 días | 2,20 ± 0,42 | 1,94 ± 0,34 | 1,88 ± 0,31 | 1,98 ± ,40 |

Mostrado en media ± desviación estándar. * p<0.05 vs basal; # p<0.05 vs grupo control

3.3 Parámetros inmunológicos en la leche materna

Un marcador de inflamación reconocido para la mastitis es el nivel de IL-8 en la leche. En el GP I, se observó una disminución significativa progresiva en el tiempo de los niveles de esta citocina en leche. Al finalizar la intervención los niveles de IL-8 fueron significativamente menores en este grupo que en el grupo control ($p=0,003$). En el GP II, se observó una tendencia a la baja a los 21 días de tratamiento ($p=0,067$) (tabla 14). Se observó una relación directa entre los niveles de IL-8 y la carga bacteriana tanto con la carga de bacterias totales en leche así como con la carga de *Staphylococcus* y *Streptococcus* ($p=0,000$, $p=0,008$ y $p=0,007$, respectivamente). Se observa así que el nivel de IL-8 aumentó significativamente entre 0,125 y 0,082 unidades por cada unidad de recuento de bacterias. Además, se observó que las mujeres con grietas del pezón mostraron valores más altos de IL-8 que las mujeres que no sufrieron de grietas ($p=0,020$). Esta asociación fue independiente del grupo de intervención.

En cuanto a los valores de Inmunoglobulina A en leche no mostraron cambios significativos ni respecto a los valores basales ni entre los grupos de intervención (tabla 14). Sólo en el caso del grupo GP I se observaron niveles basales ligeramente superiores al resto de los ($p=0,027$), pero al final de la intervención, dichos niveles disminuyeron ($p=0,036$) hasta unos niveles equivalentes al resto de los grupos de intervención.

Tabla 14. Parámetros inmunológicos en leche materna.

| IL-8 (log10 pg/mL) | G. control | G.probiótico I | G.probiótico II | G.probiótico III |
|--------------------|-------------|------------------------|-----------------|------------------|
| 0 días | 2,53 ± 0,49 | 2,72 ± 0,56 | 2,52 ± 0,43 | 2,38 ± 0,62 |
| 7 días | 2,61 ± 0,48 | 2,44 ± 0,61* | 2,45 ± 0,42 | 2,40 ± 0,56 |
| 14 días | 2,58 ± 0,56 | 2,43 ± 0,63* | 2,39 ± 0,36 | 2,40 ± 0,50 |
| 21 días | 2,75 ± 0,61 | 2,31 ± 0,57* | 2,32 ± 0,36* | 2,41 ± 0,52 |
| | | | | |
| IgA (log10 pg/mL) | G. control | G.probiótico I | G.probiótico II | G.probiótico III |
| 0 días | 5,4 ± 0,6 | 5,9 ± 0,2 [#] | 5,4 ± 0,5 | 5,6 ± 0,5 |
| 21 días | 5,4 ± 0,6 | 5,6 ± 0,5* | 5,4 ± 1,31 | 5,5 ± 0,5 |

Los valores se muestran como media ± desviación estándar. * $p<0,05$ vs basal; [#] $p<0,05$ vs grupo control.

3.4 Evaluación del dolor de pecho

Se pidió a las mujeres del estudio que valoraran el nivel de dolor en una escala entre el 1 y el 10 en la que el 1 correspondía con un dolor intenso y 10 a la ausencia de dolor. Al inicio de la intervención la media de puntuación de intensidad de dolor se encontraba entre 3,48 y 4,78, no detectándose diferencias significativas entre los grupos. Al finalizar la intervención todos los grupos habían mejorado respecto a la valoración basal ($p=0,000$), sin embargo la mejoría a lo largo del tiempo fue significativamente mayor en los tres grupos experimentales que recibieron el tratamiento probiótico I ($p=0,035$, $p=0,000$ y $p=0,028$, para GP I, II y III respectivamente). Estas diferencias fueron especialmente patentes a los 7 días de la intervención, momento en el cual las mujeres del grupo de control apenas percibieron cambios en la sintomatología de dolor en contraste con las mujeres del grupo probiótico en las que ya se observaba una diferencia significativa respecto a los valores basales y al propio grupo control (figura 9). Los valores de puntuación de la escala de dolor se clasificaron a su vez en tres categorías: 1-4 dolor intenso, de 5 a 7 dolor medio y 8-10 se consideró una lactancia cómoda sin molestias significativas. El riesgo de padecer dolor intenso en la mama fue más de 3 veces inferior en los grupos que consumieron tratamiento probiótico respecto al que consumió ($p=0,032$, $p=0,000$ y $p=0,045$, para los grupos GP I, II y III respectivamente).

Al final del tratamiento, sólo el 50% de las mujeres en el grupo control declararon ausencia de dolor en la mama ligeras molestias (puntuación entre 8 y 10), en contraste con el 76,5% de las mujeres del GP I, 70% en el GP II y 65% de las mujeres en el GP III.

Por último, se encontró una asociación entre la carga bacteriana y la puntuación del dolor de forma que a mayor carga de bacterias totales o carga de *Staphylococcus*, mayor intensidad de dolor ($p=0,029$, $p=0,057$ respectivamente).

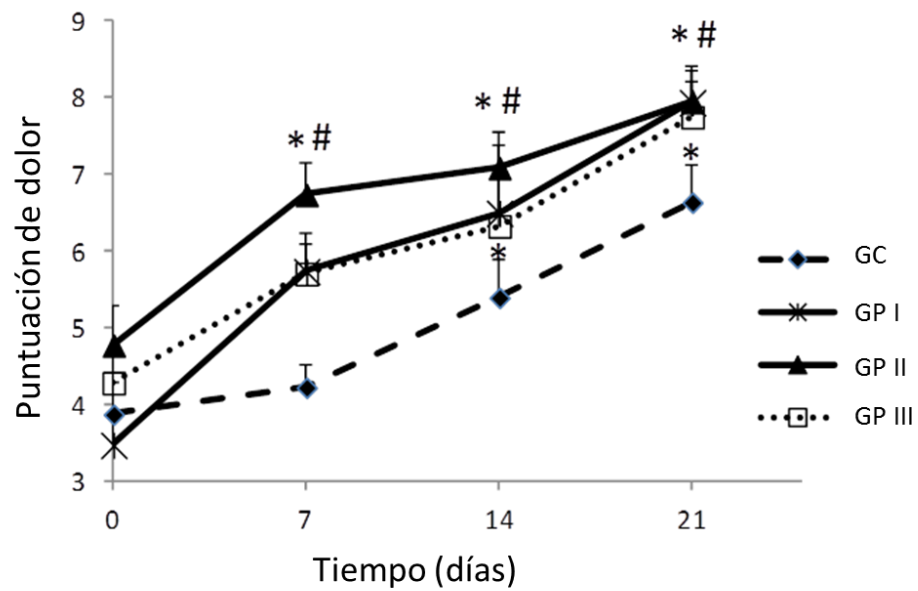


Figura 9. Evolución puntuación de dolor. Los datos se presentan como media \pm SEM. GC: grupo control; GP: grupo probiótico.

* $p < 0,05$, frente al basal. # $p < 0,05$, para cada tratamiento probiótico vs grupo control en cada momento.

Con el fin de evaluar la percepción de dolor de una forma más completa se utilizó la adaptación del cuestionario de MacGill validada en España. Este cuestionario evalúa cuatro dimensiones del dolor: valor sensorial intensidad, de valores de intensidad afectiva, de valores de intensidad de corriente y de valores de intensidad de evaluación (tabla 15).

Tabla 15. Los resultados de la adaptación española del cuestionario de dolor de McGill.

| | Grupo control | G. Probiótico I | G. Probiótico II | G. Probiótico III | Valor - p Kruskal-Wallis |
|-----------------------|---------------|-----------------|------------------|-------------------|-----------------------------|
| Tiempo 0 | | | | | |
| Intensidad sensorial | 7,88 ± 3,56 | 5,91 ± 2,31 | 6,22 ± 2,33 | 6,50 ± 2,04 | 0,293 |
| Intensidad afectiva | 5,19 ± 2,45 | 3,87 ± 1,96 | 3,70 ± 2,30 | 4,08 ± 2,24 | 0,131 |
| Intensidad actual | 1,08 ± 0,27 | 0,91 ± 0,29 | 1,04 ± 0,21 | 0,92 ± 0,28 | 0,067 |
| Intensidad evaluativa | 1,12 ± 0,43 | 0,91 ± 0,29 | 0,96 ± 0,37 | 0,92 ± 0,50 | 0,254 |
| 7 días | | | | | |
| Intensidad sensorial | 6,92 ± 2,17 | 4,35 ± 2,95 | 4,48 ± 2,86 | 5,71 ± 2,71 | 0,023 |
| Intensidad afectiva | 3,81 ± 2,00 | 1,91 ± 2,19 | 1,70 ± 2,01 | 2,92 ± 2,32 | 0,004 |
| Intensidad actual | 1,00 ± 0,40 | 0,87 ± 0,34 | 0,96 ± 0,21 | 1,00 ± 0,29 | 0,465 |
| Intensidad evaluativa | 1,12 ± 0,43 | 0,74 ± 0,45 | 0,78 ± 0,42 | 0,92 ± 0,41 | 0,016 |
| 14 días | | | | | |
| Intensidad sensorial | 6,40 ± 3,71 | 3,89 ± 2,40 | 3,77 ± 2,51 | 4,86 ± 2,82 | 0,011 |
| Intensidad afectiva | 2,80 ± 2,50 | 1,11 ± 1,85 | 1,32 ± 1,89 | 2,41 ± 2,32 | 0,015 |
| Intensidad actual | 0,96 ± 0,35 | 0,84 ± 0,37 | 0,91 ± 0,29 | 0,86 ± 0,35 | 0,679 |
| Intensidad evaluativa | 1,00 ± 0,41 | 0,68 ± 0,48 | 0,73 ± 0,46 | 0,91 ± 0,43 | 0,069 |
| 21 días | | | | | |
| Intensidad sensorial | 5,27 ± 4,24 | 3,06 ± 2,56 | 2,85 ± 2,56 | 3,70 ± 2,90 | 0,07 |
| Intensidad afectiva | 2,05 ± 2,36 | 0,53 ± 1,23 | 0,95 ± 1,88 | 1,40 ± 2,01 | 0,032 |
| Intensidad actual | 1,05 ± 0,38 | 0,71 ± 0,47 | 0,85 ± 0,37 | 0,80 ± 0,52 | 0,104 |
| Intensidad evaluativa | 0,95 ± 0,58 | 0,58 ± 0,53 | 0,51 ± 0,45 | 0,51 ± 0,75 | 0,025 |

Los valores se muestran como media ± desviación estándar

Para la escala de intensidad sensorial, los valores medios estimados de los 3 grupos experimentales informaron significativamente menor dolor que las mujeres en el grupo control ($p=0,000$, $p=0,001$ y $p=0,040$, respectivamente). IL-8 se identificó como una covariable que influye en la escala de intensidad sensorial de forma que a medida que los niveles de IL-8 aumentan una unidad se incrementa la puntuación en la escala de dolor en 0,63 ($p=0,037$). Al comienzo del estudio, entre el 83 y el 92% de las mujeres describieron su dolor como de carácter punzante, penetrante y agudo. Al final de

la intervención, el 73% de las mujeres en el grupo control continuó identificando su dolor con estas características frente al 53% del GP I, 55% del GP II y 65% en el GP III (Tabla 16).

El cuestionario valora también un aspecto muy importante del dolor que es el aspecto afectivo o psicológico del dolor, en definitiva qué sentimientos genera el dolor en estas mujeres. En general se observó una mejora significativa del tratamiento en los grupos probióticos I y II ($p=0,011$ y $p=0,010$). En cuanto a los sentimientos generados por el dolor en las mujeres del estudio, entre el 78 y el 100% describieron al inicio del estudio la sensación de ira y disgusto. Al final del tratamiento, 63,6% de las mujeres en el grupo control todavía describía sentir rabia/disgusto en contraste con el 29,4% en el GP I, 35% del GP II y 45% en el GP III (Tabla 13). El 57 - 85% de las mujeres describieron sentir miedo en el inicio de la intervención. El saber que sentirían dolor al dar el pecho a sus hijos les hacía temer el momento de las tomas. Al final del tratamiento, si bien la sensación de miedo se había reducido en todos los grupos en el grupo control todavía el 27,3% de las mujeres declaraba seguir sintiendo ese temor frente al 5,9%, 10% y 15% en los 3 grupos probióticos (Tabla 16).

El dolor también se relacionó con sentimientos de angustia, ansiedad y pena. Entre el 66,7 y el 82,6% de las mujeres manifestó tener estos sentimientos al inicio del tratamiento. Después de 3 semanas de tratamiento, se observó una reducción importante en los grupos experimentales en comparación con el grupo control (31,8% de las mujeres del grupo control marcaron estos indicadores frente a 5,9% en el GP I, 15% en el GP II y 20% en el GP III).

El tratamiento exhibió un efecto significativo en la intensidad de evaluación del dolor (temporal, intermitente, aumentando, constante, persistente). En particular, en los grupos probióticos I y II se observó una reducción en la incidencia del 30% en esta escala en comparación con el grupo control ($p=0,035$).

Tabla 16. Los resultados de la adaptación española del cuestionario de dolor MacGill. Los valores se muestran como porcentaje de sujetos seleccionar al menos un elemento de cada subescala .

| | Tiempo 0 | | | | Tiempo 21 días | | | |
|-------------------------------|----------|--------|--------|--------|----------------|--------|--------|--------|
| | GC | GP I | GP II | GP III | GC | GP I | GP II | GP III |
| Intensidad sensorial | | | | | | | | |
| Temporal 1 | 73,10% | 73,10% | 82,60% | 66,70% | 59,10% | 59,10% | 45,00% | 45,00% |
| Térmica | 73,10% | 87% | 78,30% | 70,80% | 45,50% | 35% | 40,00% | 50,00% |
| Presión constrictiva | 84,60% | 78,30% | 69,60% | 91,70% | 63,60% | 41,20% | 35,00% | 50,00% |
| Presión puntiforme/incisiva | 92,30% | 91,30% | 91,30% | 83,30% | 72,70% | 52,90% | 55,00% | 65,00% |
| Presión de tracción gravativa | 73,10% | 60,90% | 65,20% | 66,70% | 40,90% | 29,40% | 25,00% | 30,00% |
| Espacial | 92,30% | 82,60% | 95,70% | 91,70% | 77,30% | 52,90% | 55,00% | 65,00% |
| Viveza | 76,90% | 82,60% | 87% | 79,20% | 59,10% | 41,20% | 25% | 40,00% |
| Intensidad afectiva | | | | | | | | |
| Temor | 84,60% | 60,90% | 56,50% | 62,50% | 27,30% | 5,90% | 10,00% | 15,00% |
| Autonómica/Vegetativa | 50% | 56,50% | 43,50% | 29,20% | 14% | 5,90% | 10,00% | 10,00% |
| Castigo | 61,50% | 47,80% | 39,10% | 50% | 27,30% | 0,00% | 10,00% | 10% |
| Tensión/Cansancio | 76,90% | 56,50% | 56,50% | 66,70% | 27,30% | 5,90% | 15,00% | 30,00% |
| Cólera/Disgusto | 100% | 78,30% | 87% | 95,80% | 64% | 29,40% | 35% | 45,00% |
| Pena/Ansiedad | 76,90% | 82,60% | 66,70% | 70,80% | 31,50% | 5,90% | 15,00% | 20,00% |
| Intensidad actual | | | | | | | | |
| Intensidad | 100% | 91,30% | 100% | 91,70% | 96% | 70,60% | 85% | 75,00% |
| Intensidad evaluativa | | | | | | | | |
| Temporal 2 | 96,20% | 91,30% | 91,30% | 83,30% | 81,80% | 52,90% | 45,00% | 70,00% |

3.5 La aparición de los trastornos gastrointestinales y los tratamientos farmacológicos

El consumo de analgésicos disminuyó progresivamente durante todo el estudio en todos los grupos (tabla 17). Sin embargo, las voluntarias en el GP III consumieron significativamente menos analgésicos que mujeres en el grupo control ($p=0,046$).

En cuanto a la tolerancia del tratamiento probiótico no se detectaron efectos adversos relacionados al consumo de la cepa probiótica en ninguna de sus dosis. Tampoco se observaron diferencias en la incidencia de diarrea ($p=0,718$) o flatulencia ($p=0,905$ entre los grupos).

Tabla 17. El consumo de analgésicos.

| | G. control | Grupo probiótico I | Grupo probiótico II | Grupo probiótico III |
|----------------|------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| 0 días | 57,7% | 36,4% | 37,5% | 37,5% |
| 7 días | 38,5% | 17,4% | 16,7% | 20,8% |
| 14 días | 26,9% | 17,4% | 16,7% | 12,5% |
| 21 días | 15,4%* | 0,0%* | 25%* | 8,3%*# |

Los valores son el porcentaje de mujeres que informan del consumo de analgésicos. * $p<0.05$ vs basal;

$p<0.05$ vs grupo control

La microbiota del tracto gastrointestinal es un ecosistema complejo y dinámico que desempeña un importante papel en el desarrollo del ser humano. Una amplia variedad de microorganismos la componen, los cuales en conjunto realizan funciones de tipo intestinal, nutricional e inmunitario, con la importancia que representan.

La adquisición de esta microbiota comprende un proceso muy complejo que influye en la salud del individuo desde su nacimiento. Esta microbiota incluso llega a instaurarse antes del nacimiento, ya que en la actualidad se sabe que el feto no es de naturaleza estéril sino que desde antes del nacimiento posee ya cierta carga microbiana. Esta teoría ha quedado demostrada ya que se han aislado bacterias en el cordón umbilical y en el meconio de los recién nacidos (Jiménez y col. 2005; Jiménez y col. 2008a). A partir del nacimiento, la carga bacteriana que se transfiere al recién nacido es de gran importancia para su desarrollo y la leche materna es una importante fuente de bacterias para el intestino del lactante (Martin y col. 2003).

En los últimos años, debido a los beneficios potenciales o probados para el lactante, se ha recomendado la adición a las fórmulas lácteas de una serie de compuestos no nutritivos y nutrientes semiesenciales, entre ellos determinadas cepas bacterianas (probióticos). La inclusión en las fórmulas lácteas de bacterias probióticas aisladas de la leche humana podría ser una solución válida para la mejora del equilibrio microbiano intestinal de los lactantes que no puedan tomar leche de su madre, obteniéndose de esta manera los beneficios atribuidos clásicamente a la lactancia natural.

Los efectos beneficiosos que aportan los probióticos han sido demostrados en multitud de estudios, y a la hora de comercializar una cepa de probiótico, es necesario realizar estudios que demuestren que un consumo continuo de dicha cepa es bien tolerado por el organismo y que no muestra efectos adversos. Para ello se realizan estudios *in vitro*, donde se demuestra el potencial probiótico de determinada cepa, y estudios con animales de experimentación para demostrar la seguridad del probiótico (Maldonado Lozano y col. 2014c). En el caso de *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, tras comprobar su potencial probiótico en ensayos *in vitro* (Pérez-Cano y col. 2006), se realizaron estudios de seguridad en animales de experimentación (Lara-Villoslada y col. 2007) viéndose que su consumo era bien tolerado y que no producía efectos adversos.

Administración de una fórmula infantil suplementada con *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 a lactantes de 1 y 6 meses de edad.

Existen estudios que demuestran como los niños alimentados con leche materna son menos propensos a padecer enfermedades (Newburg, 2005). Probablemente sea debido, en parte, a la carga bacteriana que es transferida de madre a hijo a través de la leche, lo que hace que el niño se desarrolle de una manera más saludable y sea menos propenso a padecer enfermedades. Además, se ha demostrado como la microbiota intestinal de los lactantes alimentados con leche materna es diferente a la de los lactantes alimentados con fórmulas infantiles; los primeros poseen una microbiota en la que predominan lactobacilos y bifidobacterias mientras que en los alimentados con fórmula existe una menor proporción de estas bacterias y una mayor variedad y cantidad de bacteroides y clostridios (Harmsen y col. 2000a). Sin embargo, en numerosas ocasiones la lactancia materna no siempre es posible y hay que recurrir a la lactancia artificial.

Inicialmente, las fórmulas infantiles fueron diseñadas para poder proporcionar los nutrientes necesarios para el correcto crecimiento y desarrollo del lactante cuando no era posible la lactancia natural. Hoy en día, la investigación en el campo de la nutrición infantil se centra principalmente en la búsqueda de nuevos componentes bioactivos que imiten las propiedades funcionales de la leche humana.

En los preparados para lactantes dirigidos a niños de hasta 6 meses de edad, cuyo desarrollo depende de forma casi exclusiva de su alimentación, no es fácil introducir nuevos componentes, ya que no tienen la capacidad de autorregulación que irán adquiriendo con el tiempo. Para poder introducir nuevos componentes en este tipo de fórmulas lácteas, es necesario realizar numerosos estudios clínicos con una muestra de población representativa que avalen tanto la seguridad de la modificación propuesta, como su carácter beneficioso respecto a la composición ya aceptada. De ahí que algunos informes emitidos por las comisiones de expertos concluyan que determinadas modificaciones, si bien son totalmente seguras para la salud del recién nacido, no son aceptadas por no suponer un claro beneficio respecto a las fórmulas existentes en ese momento. Así, el Comité de Nutrición de ESPGHAN (2011) informó que existían pocos datos para sustentar el consumo de forma sistemática de fórmulas de inicio suplementadas con probiótico en lactantes menores de 4 meses.

En el estudio que se presenta en esta tesis, se pretendió estudiar la seguridad y la tolerancia de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 cuando es adicionado a un preparado para lactantes y se le suministra a lactantes sanos de 1-6 meses de vida. No se dieron reacciones adversas tras el consumo de la fórmula suplementada con el probiótico, y se comprobó que dicha fórmula era segura y bien tolerada.

Cabe recordar que nuestra cepa probiótica *L. fermentum* es de origen humano, ya que fue aislada originalmente de leche de mujeres lactantes, concretamente cuatro días después del parto (Martín y col. 2005), y que tanto su seguridad como su potencial probiótico ha sido ya demostrado tanto en modelos animales como en humanos, incluyéndose en estos últimos varios estudios realizados en bebés de 6 a 12 meses de edad (Maldonado y col. 2012) y en adultos (Olivares y col. 2007; Lara-Villoslada y col. 2009). En el estudio de Maldonado y col (2012) se analizaron una serie de datos antropométricos, tales como el perímetro craneal, el peso y la longitud, y en ningún caso se vieron diferencias entre los grupos, lo que demostraba su seguridad. Estos datos concuerdan con los observados en otros estudios realizados con distintos probióticos y centrados en comprobar la seguridad y la tolerancia del consumo de una fórmula suplementada con probióticos (Saavedra y col. 2004; Weizman y col. 2006; Chouraki y col. 2008). Un estudio doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo, llevado a cabo en lactantes de 6 meses que consumieron una fórmula de continuación suplementada con *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, otro probiótico aislado de la leche humana, demostró ser segura y bien tolerada, no presentándose casos de reacciones adversas (Maldonado y col. 2010b).

En el presente estudio se analizaron los datos antropométricos y se pudo observar que los z-scores del peso y de la longitud para la edad, mostraban unas tasas de crecimiento en ambos grupos comparables a los estándares de crecimiento para niños de su edad. Como estos estándares están basados en niños sanos, estos resultados son indicativos de la suficiencia nutricional y la seguridad de nuestra fórmula experimental. No se observaron diferencias en los datos antropométricos entre el grupo probiótico y el grupo control; sin embargo, al final de la intervención pudimos observar que los niños del grupo probiótico eran significativamente más altos en comparación con los lactantes del grupo que tomaba la fórmula de inicio estándar. Existen informes anteriores sobre estudios similares realizados con otras cepas probióticas, en los que se observó algún efecto de la intervención sobre el peso y la longitud de los lactantes (Ventd y col. 2006; Chouraqi y col. 2008). La explicación de este efecto no está clara, pero tal vez la actividad de las bacterias en la fisiología de la mucosa pueda influir

sobre la digestión y absorción de nutrientes. Para corroborar estos resultados e investigar los mecanismos involucrados deberán realizarse estudios futuros diseñados para detectar estas diferencias en el crecimiento.

No se observaron efectos adversos relacionados con el consumo de la fórmula experimental. Los trastornos gastrointestinales leves tales como cólico, regurgitación, consistencia de las heces y estreñimiento, son síntomas indicativos de la tolerancia de una fórmula infantil y no hubo diferencias en estos síntomas entre ambos grupos de intervención, evidenciando que la fórmula experimental que contiene la cepa probiótica fue bien tolerada. Además, el número de niños que abandonaron el estudio por problemas de regurgitación fue muy bajo y similar en ambos grupos. Las tasas de incidencia de cólico infantil, la regurgitación y el estreñimiento estaban dentro del rango de los lactantes españoles a esta edad (Infante-Pina y col. 2005).

Existen datos controvertidos en cuanto al efecto de los probióticos sobre la microbiota fecal (ESPGHAN, 2011), pero en un estudio realizado en lactantes de 6-12 meses de edad que tomaron fórmula suplementada con *L. fermentum* CECT5716, se comprobó que existían mayores recuentos de lactobacilos y bifidobacterias en las heces (Maldonado y col. 2012). En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas en la microbiota fecal entre ambos grupos, pero la cepa probiótica *L. fermentum* CECT5716 pudo ser detectada viva en las heces de 53% de los lactantes en el grupo probiótico, lo que demuestra que esta cepa es capaz de sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal. Los oligonucleótidos utilizados para detectar la cepa *L. fermentum* CECT5716 eran específicos y también reconocieron dos muestras positivas del grupo control, probablemente debido a la presencia natural de cepas de *L. fermentum* muy similares a CECT5716 en las heces de estos dos bebés.

En cuanto al estado de salud de los lactantes, no hubo diferencias significativas entre los dos grupos en las tasas de incidencia de las infecciones respiratorias, el problema más común en la infancia, si bien la incidencia fue menor en el grupo probiótico. En un estudio anterior realizado en niños de 6-12 meses de edad, el consumo de una fórmula de continuación que contenía la misma cepa de *L. fermentum*, indujo una reducción significativa del 26% en la incidencia de infecciones respiratorias (Maldonado y col. 2012). Cabe destacar que en ese estudio la reducción de la incidencia de las infecciones respiratorias fue debida principalmente a un efecto sobre la infección recurrente en vías respiratorias altas. Durante los primeros 6 meses de vida la incidencia de las infecciones recurrentes es

muy baja y esto podría explicar la falta de efecto en las infecciones respiratorias observado en este estudio. Existen datos de que la adición de probióticos a una fórmula infantil reduce la incidencia de enfermedades como la otitis y las enfermedades respiratorias (Weizman y col. 2005; Rautava y col. 2009; Maldonado y col. 2010; Taipale y col. 2011), si bien en las revisiones sistemáticas llevadas a cabo no se constataron diferencias significativas en la duración de la enfermedad ni en el número de episodios (ESPGHAN, 2011; Mugambi y col. 2012). Además, la reducción en la incidencia de infecciones hace que se recurra con menor frecuencia al uso de antibióticos (Rautava y col. 2009) y los efectos se asocian a las propiedades de tipo antimicrobianas e inmunomoduladoras de las cepas de probióticos empleadas en los estudios.

Una de las patologías más recurrentes en los primeros años de vida son los episodios diarreicos. El consumo de la fórmula experimental que contiene *L. fermentum* se relacionó con una reducción significativa del 71% en la incidencia de infecciones gastrointestinales en comparación con los bebés alimentados con la fórmula estándar. Este resultado está en línea con los resultados previos observados en lactantes de 6 a 12 meses de edad en los que se detectó una reducción del 46% de la incidencia de infecciones gastrointestinales durante el periodo de intervención utilizando la misma cepa probiótica (Maldonado y col. 2012). La tasa de reducción de las infecciones gastrointestinales observados en el grupo probiótico también es comparable al de otros ensayos que informaron de una exitosa prevención de los episodios de diarrea por infecciones gastrointestinales adquiridas en la comunidad utilizando una fórmula infantil suplementada con *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius* y *Bifidobacterium bifidus* + *Streptococcus termophilus* (Saavedra y col. 1994; Weizman y col. 2005; Corrêa y col. 2005; Picaud y col. 2010; Maldonado y col. 2010).

Ambas fórmulas, control y experimental, contenían GOS (0,3 g / 100 ml). Los efectos beneficiosos de los prebióticos los desarrollan a través de su influencia sobre la composición de la microbiota intestinal y su capacidad para generar productos de fermentación (ácidos grasos de cadena corta) con diversas funciones biológicas (Laparra y col. 2010). La presencia de GOS en la fórmula experimental puede tener un efecto sinérgico con el *L. fermentum* mejorando el efecto beneficioso de esta cepa probiótica; sin embargo, puesto que la fórmula control también contenía la misma concentración de GOS, no es posible aventurarse a sacar una conclusión en este sentido.

Nuestra cepa probiótica ha demostrado en estudios previos que posee una capacidad de tipo antimicrobiano gracias a la secreción de sustancias que inhiben el crecimiento de posibles patógenos

(Martín y col. 2003; Martín y col. 2005; Olivares y col. 2006) por lo que, probablemente, esta sea una de las razones de ese descenso en la incidencia de infecciones, al igual que el promover un aumento de lactobacilos en el contenido colónico de los niños. Otra posible explicación para esta bajada en la incidencia de infecciones puede deberse al carácter de tipo inmunomodulador que posee nuestra cepa probiótica, ya que en ensayos *in vitro* y en animales de experimentación se observó como *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 poseía la capacidad de inducir en macrófagos una respuesta de tipo Th1 (Diaz Roperó y col. 2007). Es muy probable que el sistema inmune innato se estimule hacia la diferenciación de linfocitos de tipo Th1, secretándose moléculas como el IFN γ , muy importante en la respuesta contra las infecciones por virus; se ha demostrado que *Lactobacillus fermentum* posee una alta capacidad de activar a las células NK (Pérez-Cano y col. 2010) y se comprobó que el lactobacilo ejercía una función positiva sobre la diferenciación y la maduración de las células NK. Además, la administración de *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 en adultos favoreció un aumento de las poblaciones de células NK cuando era utilizado como coadyuvante en la administración de una vacuna (Olivares y col. 2007). Esta estimulación del sistema inmune innato a nivel de las células NK y de los macrófagos parece ser uno de los factores clave por los que se producen estos beneficios frente a las infecciones (Weizman y col. 2005).

Sería conveniente realizar nuevos estudios con fórmulas infantiles enriquecidas con bacterias probióticas, utilizando distintas cepas en un mismo estudio, para así poder seleccionar aquella que produzca los efectos más deseados, ya que en los estudios publicados, a la hora de añadir una cepa de probiótico a una fórmula infantil, cada cepa o mezcla de cepas produce un efecto determinado (Weizman y col. 2005). Existen estudios en los que se dan similares resultados en la reducción de infecciones añadiendo a la fórmula infantil una combinación de dos probióticos distintos. Esta es otra opción a seguir, ya que se han dado muy buenos resultados en la reducción de diarreas y de episodios febriles tras añadir *Bifidobacterium longum* BL999 y *Lactobacillus rhamnosus* LPR a una fórmula infantil destinada a lactantes desde el primer mes de vida (Chouraqui y col. 2008). Una posible explicación a este hecho está basada en el incremento de la función barrera que confieren los probióticos. Esta es una de las funciones clave de los probióticos y es muy probable que los efectos positivos alcanzados en los estudios expuestos en esta tesis se deban en gran parte a este hecho. Efectos íntimamente relacionados fueron obtenidos en estudios previos, donde se manifestó una propiedad beneficiosa del probiótico al demostrar que era capaz de mejorar las condiciones del epitelio intestinal al inducir una mayor expresión de mucinas, glicoproteínas que recubren la superficie del intestino y que ayudan a mantener

su integridad (Olivares y col. 2006), impidiendo de esta forma la entrada de patógenos al aumentar el efecto barrera. Además, existen estudios en los que se demuestra como los probióticos son capaces de contrarrestar los efectos producidos por un patógeno a nivel del epitelio intestinal, inhibiendo el efecto de disrupción del epitelio e induciendo un aumento en la expresión de proteínas de unión, las cuales realizan una importantísima función a nivel epitelial haciendo que la función barrera sea lo más efectiva posible, inhibiendo la entrada de patógenos y reduciendo la permeabilidad intestinal (Bermúdez-Brito y col. 2012).

Tras evaluar la seguridad a corto plazo de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 en el estudio realizado en lactantes de 1 a 6 meses de edad que consumieron una fórmula infantil suplementada con la cepa probiótica entre los 1 y 6 meses de edad, en donde se pudo evidenciar que el consumo de dicha fórmula no afectaba al crecimiento de los lactantes, se realizó un seguimiento de los niños a los 3 años de edad para evaluar los posibles efectos que pudieran derivarse a largo plazo como consecuencia del consumo de la referida fórmula.

Epidemiológicamente existen datos que apuntan a un crecimiento rápido después del parto como un factor de riesgo para la aparición de obesidad, por lo que el efecto de los preparados para lactantes sobre el aumento de peso es una fuente de preocupación (Oddy y col. 2014). Por otra parte, se ha implicado a la microbiota como uno de los factores que regulan los mecanismos de adquisición de energía y de almacenamiento (Sanz y col. 2013). Por todo ello, el estudio de los efectos a largo plazo de la fórmula probiótica experimental sobre el crecimiento, podría presentarse como un elemento clave en la evaluación de la seguridad.

En los resultados obtenidos, el consumo precoz de *L. fermentum* CECT5716 no mostró efecto alguno sobre el peso, puesto que los niños de ambos grupos tuvieron valores similares de peso en los diferentes momentos del seguimiento. Si nos fijamos en otra medida antropométrica como la talla, se observó que la diferencia de longitud entre los grupos se redujo gradualmente con el tiempo y las diferencias no fueron significativas al final del seguimiento a los 3 años. Por lo tanto, en términos de crecimiento, los valores de peso y talla a los 3 años fueron similares en niños que consumieron la fórmula infantil experimental y los que tomaron la fórmula estándar.

Sobre los efectos a largo plazo del consumo de probióticos en los primeros meses de la vida, algunos estudios han analizado específicamente los efectos sobre el crecimiento (Rinne y col. 2006;

Luoto y col. 2010), pero la mayoría de los estudios realizados se han centrado en evaluar el efecto protector sobre el desarrollo de alergia y a los aspectos de seguridad se les ha prestado poca atención (Kuitunen y col. 2009; Abrahamsson y col. 2013; Wickens y col. 2013). Estos estudios evaluaron los efectos entre los 2 y los 10 años después de la intervención. Al igual que se ha observado en el presente estudio de seguimiento con *L. fermentum* CECT5716, no se evidenciaron efectos sobre el crecimiento con la excepción del estudio de Luoto y col (2010). Reseñar que este estudio mostró un efecto de la intervención temprana con el probiótico al moderar la fase inicial de aumento excesivo de peso, especialmente entre los niños que más tarde adquirieron sobrepeso.

El consumo de la fórmula para lactantes suplementada con *L. fermentum* CECT5716 parecía reducir el riesgo de padecer infecciones gastrointestinales durante el período de intervención a los 1-6 meses de edad, pero a los 3 años se alcanzaron valores similares de incidencia de las infecciones entre los niños de ambos grupos. Por lo tanto, el efecto protector de la cepa probiótica no se mantuvo con el tiempo una vez que la intervención finalizó. Los mecanismos propuestos para la actividad antiinfecciosa de esta cepa probiótica incluyen la competencia con patógenos, la producción de un entorno fisiológicamente restrictivo, la competencia por los sustratos, la producción de compuestos antibacterianos y la mejoría de la respuesta inmunológica (Olivares y col. 2006; Olivares y col. 2007). La mejoría de la respuesta inmunológica contra los patógenos por cepas de probióticos se ha relacionado con una activación de la respuesta inmune innata que no es permanente en el tiempo. Esta respuesta específica contra patógenos requiere la coincidencia de la activación de la respuesta innata por la cepa probiótica con la presencia de antígenos de los patógenos (Olivares y col. 2007; Goto y col. 2013). De acuerdo con esto, no se detectaron cambios en la IgA fecal a causa de la intervención con el probiótico. El resto de los mecanismos, tales como los fenómenos de competencia o producción de compuestos antibacterianos, requieren la presencia de la bacteria y son dependientes de la dosis, por lo que puede ser necesaria la administración directa de cantidades de la cepa para observar los efectos.

Ciertas cepas de probióticos se han relacionado con mejoras en el confort gastrointestinal, tales como la reducción de la flatulencia, cólicos del lactante y del tránsito intestinal (Whelan y col. 2011; Urbanska y col. 2014; Huertas-Ceballos y col. 2014; Kortterink y col. 2014; Chau y col. 2015; Xu y col. 2015; Pärty y col. 2015;). Sin embargo, el efecto a largo plazo del consumo precoz de los probióticos sobre el bienestar intestinal ha sido poco estudiado. Abrahamsson y col (2013), en un estudio de seguimiento hasta los 7 años de edad, incluyeron datos sobre la frecuencia de la defecación y no

observaron diferencias entre los niños que recibieron la cepa de *L. reuteri* y los niños que recibieron un placebo. El presente estudio de seguimiento no mostró ningún efecto del consumo precoz de *L. fermentum* CECT 5716 en parámetros relacionados con la función intestinal como la frecuencia de las deposiciones, la flatulencia o la incidencia de dolor de abdominal. La falta de efectos a largo plazo observada en el presente estudio de seguimiento coincide con la ausencia de diferencias en la microbiota fecal entre niños que consumieron la fórmula suplementada con *L. fermentum* CECT5716 y los que consumieron la fórmula estándar.

La administración temprana de probiótico se dirige específicamente a un período crítico de la vida en que la composición de la microbiota intestinal y la capacidad de respuesta inmunológica se consolidan. Aunque, de acuerdo con la opinión de los expertos, la suplementación a corto plazo con fórmula suplementada con probióticos no plantea problemas de seguridad, es cierto que hay pocos estudios que evalúen los efectos a largo plazo de la intervención temprana con probióticos (ESPGHAN, 2011). El presente seguimiento es el primer estudio que evalúa los problemas de seguridad asociados con el crecimiento de los niños, la función intestinal, la incidencia de las enfermedades y la microbiota fecal.

Mastitis infecciosas durante la lactancia y *Lactobacillus fermentum* CETC 5716

El descubrimiento de la presencia de una microbiota fisiológica en la leche materna es un descubrimiento relativamente reciente (Martín y col. 2003) que ha dado pie a la apertura de nuevas líneas de investigación que abarcan no sólo cuál es el origen de esta microbiota, sino también cómo se modula por la madre, qué impacto tiene sobre la colonización del bebé y sus efectos sobre la salud tanto del bebé como de la madre (Martin y col. 2004; Martin y col. 2005). El estudio de esta microbiota en mujeres llevó a relacionar las mastitis infecciosas durante la lactancia con un desequilibrio o disbiosis de la microbiota natural en la leche materna. Tradicionalmente, *Staphylococcus aureus* ha sido considerado como el agente etiológico más común de mastitis; sin embargo, estudios recientes han sugerido que otros microorganismos, tales como *Staphylococcus coagulasa negativo*, están relacionados con la mastitis y el dolor de pecho durante la lactancia (Delgado y col. 2009); de hecho Jiménez y col (2008) encontraron que *Staphylococcus epidermidis* estaba presente en el 60% de los casos de mastitis. En estos casos se produce una auténtica disbiosis de la microbiota normal de la glándula mamaria, con un espectacular aumento de la concentración del agente causal, muy por encima de los límites normales, y

la desaparición del resto de las bacterias «fisiológicas » de la leche. Entre las distintas especies bacterianas que se ven reducidas en caso de mastitis se encuentran los lactobacilos (Arroyo y col. 2010).

Un estudio piloto llevado a cabo en mujeres con mastitis que reciben una combinación de cepas de *Lactobacillus*, previamente aislada de leche materna, pone por primera de vez de manifiesto el potencial del uso de bacterias probióticas para el tratamiento de la mastitis (Jiménez y col. 2008). Posteriormente, se llevó a cabo un estudio clínico en mujeres afectadas de mastitis que recibieron bien un tratamiento probiótico, *Lactobacillus salivarius* CECT5713 o *L. fermentum* CECT5716, o bien tratamiento antibiótico. Se comprobó que ambas cepas, originarias de leche materna, eran efectivas para restaurar el equilibrio de la microbiota mamaria y eliminar los síntomas clínicos de la mastitis, además de presentar una gran ventaja sobre el tratamiento antibiótico al ser más favorable la evolución de los síntomas y menos frecuentes las recurrencias y los efectos secundarios (Arroyo y col. 2010). Tras estos primeros estudios se plantean cuestiones sobre las condiciones de empleo, posología, idoneidad de la cepa, seguridad etc, que deben de ser respondidas en posteriores investigaciones.

Entre las cepas que se habían mostrado eficaces en el tratamiento de la mastitis destacaba *Lactobacillus fermentum* CECT5716. Esta cepa, procedente de leche humana, presenta un fuerte carácter antimicrobiano e inmunoestimulante (Martín y col. 2006; Olivares y col. 2006; Díaz-Roperó y col. 2007; Pérez-Cano y col. 2010) y destaca también por su gran robustez que le permite una mayor supervivencia al tracto gastrointestinal (Martín y col. 2004; Martín y col. 2006). Estas características la hicieron la cepa de elección para seguir avanzando en el conocimiento de los efectos beneficiosos de los probióticos en el tratamiento de la mastitis y que han sido tratados en la presente tesis doctoral.

El estudio de Arroyo (Arroyo y col. 2010) tenía una limitación importante que era la ausencia de un grupo placebo. El hecho de que se trabajara con mujeres que sufrían de una mastitis clínica hizo que el Comité ético descartara la inclusión de un grupo placebo que no recibiera tratamiento alguno. Por ello el grupo control recibía un tratamiento antibiótico que además no era el mismo en todas las mujeres sino que dependía del criterio del médico que lo prescribiera en función de los síntomas y de los análisis microbiológicos realizados. Aunque este diseño permitió poner de manifiesto que el tratamiento probiótico podía ser una alternativa incluso al tratamiento antibiótico hay que tener en cuenta que el mayor porcentaje de mastitis (90%) son mastitis subagudas que no requieren tratamiento antibiótico. El manejo de estas mastitis por el clínico va más dirigido a paliar los síntomas que a erradicar el problema

que lo origina, por lo que la mujer sólo recibe recomendaciones sobre pautas de vaciado del pecho para evitar acumulación de leche y analgésicos para calmar el dolor. Estas medidas son poco efectivas y la mastitis subaguda acaba progresando hacia una mastitis aguda o al abandono de la lactancia (World Health Organization, 2000). Por tanto resulta de gran interés el evaluar cómo el tratamiento probiótico con la cepa *L. fermentum* CECT5716 puede ayudar a mejorar la sintomatología de estas mastitis subagudas y poder comparar también con un grupo placebo que ayude a definir mejor la actividad de la cepa probiótica.

Otra de las cuestiones fundamentales a resolver fue la dosis recomendada. Las dosis habituales con las que se trabaja en probióticos se encuentran entre 10^8 - 10^{10} e incluso en algunos casos 10^{11} UFC/día, sin embargo las aplicaciones son diversas y hay pocos estudios que comparen en un mismo estudio diferentes dosis para establecer la dosis eficaz. En el presente estudio se decidió comparar 3 dosis crecientes de la cepa *L. fermentum* CECT5716: 3×10^9 , 6×10^9 y 9×10^9 UFC/día. El rango de dosis se eligió en base a varios aspectos. Por una parte se partió de un orden de magnitud 9log acorde a las dosis comúnmente usadas en los tratamientos probióticos (Fernández y col, 2014). Por otra parte se tuvo en cuenta la posible pérdida en viabilidad que pudiera sufrir la bacteria durante la vida útil de un posible producto en el mercado. Sobre esto hay que comentar que la demanda en el mercado es de suplementos que tengan una vida útil de unos 24 meses a temperatura ambiente. Las bacterias probióticas, como organismos vivos que son, ven afectada su viabilidad durante el periodo de almacenamiento. Para contrarrestar esta pérdida se lleva a cabo una sobredosificación en el producto final de forma que a final de caducidad se mantenga un número de viables suficiente para mantener la actividad. Teniendo en cuenta que en el mercado la sobredosificación está en torno a 0,5-1 orden de magnitud se decidió partir de una dosis máxima de 9×10^9 UFC/día hasta una dosis mínima de 3×10^9 UFC/día.

Como variable principal del estudio se eligió la carga de la especie *Staphylococcus* en la leche materna como principal agente causal de la mastitis. Los resultados mostraron cómo el consumo de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 redujo significativamente la carga de este grupo bacteriano en la leche de las mujeres. Las bacterias totales y la carga de *Staphylococcus* se correlacionaron significativamente con la percepción del dolor en las glándulas mamaria de las mujeres, lo que demuestra que las alteraciones en la microbiota de la leche están directamente relacionadas con los síntomas de dolor en esta enfermedad. La carga bacteriana también se correlacionó significativamente

con el nivel de IL-8 en la leche. Esta citoquina induce la infiltración de células inmunes en donde ocurre la infección y su concentración en la leche humana se ha propuesto como un indicador eficaz de mastitis (Hunt y col. 2013).

De acuerdo con estas asociaciones entre la carga de *Staphylococcus* y el dolor de mama, la reducción de la carga bacteriana inducida por la administración de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 redujo significativamente el dolor de mama en las mujeres. La mejora en la sintomatología fue significativa ya desde de la primera semana de tratamiento. Si bien en los estudios previos se había utilizado una encuesta simple de valoración del dolor basado en una escala de valoración de intensidad del 0 al 10, en el estudio presentado en esta tesis se incluyó un cuestionario validado de dolor que evaluó no sólo los aspectos sensoriales del dolor, sino también un aspecto muy importante del dolor que es su dimensión afectiva. En este sentido, las mujeres en el estudio describieron sentimientos de ansiedad, temor, enfado ante el problema de la mastitis. El consumo de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 mejoró significativamente estos aspectos afectivos relacionados con el dolor. Hay que tener en cuenta que, aparte de los beneficios que la lactancia materna tiene sobre la salud del bebé y de la madre, la lactancia favorece el contacto de la madre con el bebé estrechando los lazos psicológicos entre ambos. El hecho de que el momento de la lactancia se convierta en un momento doloroso para la madre puede llegar a causar una angustia emocional en la madre que la haga abandonar la lactancia.

Los mecanismos a través de los cuales la cepa *L. fermentum* CECT5716 ejerce un efecto beneficioso sobre la mastitis no están del todo claro. Entre los mecanismos antiinfecciosos que se han atribuido a las bacterias probióticas en otras localizaciones del organismo como pueden ser el tracto gastrointestinal o la mucosa vaginal están los fenómenos de competencia por adhesión al epitelio y la producción de sustancias antibacterianas. En estudios previos *in vitro* se observó una potente actividad antibacteriana frente a diversos microorganismos patógenos entre los que se encontraba *Staphylococcus aureus* (Olivares y col. 2006). Posteriormente en un estudio llevado a cabo en bebés de 6 a 12 meses se demostró que el consumo de la cepa probiótica durante 6 meses reducía de forma significativa en más de un 40% la incidencia de infecciones gastrointestinales. Algunos de los mecanismos relacionados con la actividad antiinfecciosa como por ejemplo los fenómenos de competición, podrían requerir de la presencia de la propia cepa en el epitelio de la glándula mamaria. En el estudio publicado por Arroyo y col. (2010), se demostró que la cepa *L. fermentum* CECT5716 alcanzaba la glándula mamaria tras su ingesta. Además la reducción en la carga bacteriana en la leche

materna se acompañó por un aumento significativo en el recuento de *Lactobacillus* en la leche. En el estudio objeto de esta tesis no se observaron cambios en la concentración de *Lactobacillus* en la leche materna. Sin embargo, mientras que en el estudio de Arroyo y col. (2010) no se detectaba carga de *Lactobacillus* al inicio del estudio, en nuestro estudio ya se parte de un cierto nivel de *Lactobacillus*, probablemente debido a que se ha trabajado con mujeres que sufrían mastitis subaguda y el nivel de disbiosis es menor que en las mujeres con mastitis aguda (Jiménez y col. 2015). Por otra parte, los recuentos relativamente bajos de *Lactobacillus* versus *Staphylococcus* en las muestras de leche sugiere que es improbable que el mecanismo del descenso del dolor sea simplemente un fenómeno de competencia. Algunos autores han sugerido que la activación de la respuesta inmune innata del huésped en la glándula mamaria es una característica crítica de la mastitis y que ésta podría ser el resultado de una respuesta inflamatoria a una bacteria inocua (Glynn y col. 2014). De hecho, aunque *Staphylococcus epidermidis* es común en la leche de mujeres que sufren mastitis, las cepas de esta especie también se encuentran en la leche de mujeres sanas (Heikkilä y col. 2003; Martín y col. 2007; Delgados y col. 2009b). En este sentido el carácter inmunomodulador de las cepas probióticas pueden jugar un papel clave en el control de la infección (Klostermann y col. 2008; Crispie y col. 2008).

Los estudios llevados a cabo con la cepa *Lactobacillus fermentum* CECT5716 para evaluar su efecto sobre el sistema inmune han puesto de manifiesto la peculiaridad de esta cepa para modular la respuesta inmune en función del contexto inmunológico. Así, la cepa es capaz de estimular la respuesta inmune a través de la activación de la respuesta innata (Díaz-Roperó y col. 2007; Olivares y col. 2007) pero, en caso de que la cepa se aplique sobre un sistema inflamado, ésta modula la respuesta reduciendo la respuesta inflamatoria (Perán y col. 2006; Díaz-Roperó y col. 2007; Arribas y col. 2008). Estas propiedades inmunomoduladoras de *L. fermentum* CECT5716 probablemente contribuyan en gran medida al efecto de la cepa sobre la mastitis. El género *Staphylococcus spp* está dotado de mecanismos dirigidos a evitar la fagocitosis, que es la primera línea de defensa del sistema inmune frente a los patógenos (Avall-Jääskeläinen y col, 2013). En un modelo de ratones sanos, *L. fermentum* CECT5716 aumentó la actividad fagocítica de monocitos y granulocitos. Esta actividad podría ayudar a prevenir la proliferación de estafilococos en la glándula mamaria (Díaz-Roperó y col. 2007). Otros estudios han relacionado la administración de cepas de *L. rhamnosus* y *B. animalis* durante la última fase del embarazo y/o lactancia con un incremento en los niveles de IgA y TGF- β 2 en leche (Rautava y col. 2002; Prescott y col. 2008; Nikniaz y col 2013). La IgA podría ayudar a limitar el acceso de las bacterias causantes de la mastitis al epitelio mamario mientras que TGF- β 2 es un importante factor

inmunoregulador. En el estudio objeto de la presente tesis doctoral no se observó diferencia en los niveles de IgA en leche entre el grupo que recibió la cepa probiótica y el grupo control, sin embargo, no descartamos que otros mediadores inmunológicos se hayan modificado. Son necesarios más estudios que analicen los mecanismos responsables del efecto de *L. fermentum* CECT5716 en el tratamiento de la mastitis.

En cuanto a las diferentes dosis evaluadas en el estudio no se pudo observar un efecto dosis-respuesta debido a que las tres dosis probadas indujeron ofrecieron efectos similares y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. El hecho de que no se haya observado un efecto dosis-respuesta con las dosis evaluadas puede ser debido a que las tres dosis estuvieran dentro del mismo orden de magnitud de 9log. No podemos descartar la posibilidad de que dosis significativamente más altas de *Lactobacillus* puede dar lugar a cambios en la respuesta. A la vista de los resultados, una dosis de 3×10^9 UFC/día es eficaz y suficiente para inducir efectos beneficiosos esperados. Como se ha comentado anteriormente con el fin de asegurar en el producto final una cantidad mínima de bacteria viable se procede a la sobredosificación en el momento de la fabricación de forma que se compensen las pérdidas durante la vida útil del producto que puede alcanzar los 24 meses. Con este fin es aceptable una sobredosificación de 0,5-1 órdenes de magnitud. Puesto que en el estudio se ha definido la dosis eficaz como 3×10^9 UFC/día y se ha evaluado hasta 9×10^9 UFC/día los resultados demuestran que en caso de sobredosificación tanto la efectividad como la seguridad del producto se mantienen.

La Organización Mundial de la Salud recomienda la lactancia exclusiva hasta el 6 mes de embarazo ya que la leche materna contiene todos los nutrientes y componentes necesarios para el correcto crecimiento y desarrollo del bebé. La mastitis es un problema que afecta a un porcentaje elevado de las mujeres durante el periodo de lactancia provocando no sólo importantes molestias a la madre sino también tratamientos farmacológicos que deben de ser específicos para limitar al máximo que lleguen al bebé a través de la leche. Además, la mastitis es la principal causa médica de abandono de la lactancia. Los estudios de caracterización de la leche materna llevados a cabo en los últimos años han permitido demostrar la correlación entre la carga bacteriana de ciertos grupos de bacterias en la leche de mujer y la aparición de dolor de pecho durante la lactancia (Jiménez y col. 2015). Dicha relación se ha corroborado en el estudio objeto de esta tesis doctoral.

La existencia de la circulación enteromamaria, que se intensifica al final del embarazo y durante la lactancia, y la comprobación de que las cepas de lactobacilos probióticos administrados por vía oral

llegan a la glándula mamaria, abren la interesante posibilidad de modular la microbiota mamaria mediante la ingestión de probióticos. Un aspecto interesante que deberá ser estudiado en el futuro es cómo afecta al proceso de colonización del bebé y a su desarrollo el recibir a través de la leche materna una elevada carga de estafilococos que en algunos casos de mastitis puede llegar a ser hasta 3 órdenes de magnitud mayor que la carga presente en la leche de una mujer sana.

La capacidad de modular la microbiota mamaria a través de la intervención probiótica permite también actuar sobre la microbiota antes de que se produzca las disbiosis que dé lugar después a la mastitis. Un estudio posterior de nuestro grupo de investigación realizado en mujeres sanas reclutadas en la primera semana tras el parto ha demostrado que *L. fermentum* CECT5716 es capaz de reducir la carga de estafilococos en leche materna previniendo del desarrollo de la mastitis en un 51% (Hurtado y col. 2017). Un resultado similar se ha obtenido con otra cepa obtenida de leche materna perteneciente a la especie *Lactobacillus salivarius* (Fernández y col. 2016b).

Como conclusión general el uso de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 para el manejo de la mastitis resulta en una estrategia eficiente, segura y natural que permite resolver los problemas de disbiosis de la microbiota mamaria relacionados con la mastitis. Todo esto puede tener un impacto favorable no sólo para la salud de la madre sino también para la del hijo lactante.

7.-CONCLUSIONES

1. El consumo de una fórmula láctea de inicio suplementada con *Lactobacillus fermentum* CECT5716 es seguro y bien tolerado en lactantes desde el primer mes de vida.
2. El consumo de una fórmula láctea de inicio suplementada con *Lactobacillus fermentum* CECT5716 puede mejorar la salud de los lactantes, sobre todo reduciendo la incidencia de infecciones gastrointestinales.
3. El consumo de una fórmula suplementada con *Lactobacillus fermentum* CECT5716 en lactantes desde el mes de vida es seguro y no produce alteraciones a largo plazo, al menos hasta los 3 años de edad.
4. En las mujeres lactantes afectas de mastitis, la ingesta diaria de 3×10^9 ufc de *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 es efectiva y suficiente para inducir un descenso de la carga de *Staphylococcus* en la leche.
5. En las mujeres lactantes afectas de mastitis, la ingesta diaria de 3×10^9 ufc de *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 conlleva efectos beneficiosos, disminuyendo el dolor en la glándula mamaria asociado con la infección por *Staphylococcus*.

8.-BIBLIOGRAFÍA

- *Abrahamse E, Minekus M, Van Aken GA, Van de Heijning B, Knol J, Barke N et al. Development of the digestive system: experimental challenges and approaches of infant lipid digestion. *Food Dig* 2012; 3: 63-77.
- *Abrahamsson TR, Jakobsson T, Béittcher MF, Fredrikson M, Jenmalm MC, Björkstén B, et al. Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1174-1180.
- *Abrahamsson TR, Jakobsson T, Björkstén B, Oldaeus G, Jenmalm MC. No effect of probiotics on respiratory allergies: a seven year follow-up of a randomized controlled trial in infancy. *Pediatr Allergy Immunol* 2013; 24: 556-561.
- *Abrams SA. Building bones in babies: can and should we exceed the human milk-fed infant's rate of bone calcium accretion?. *Nutr Rev* 2006; 64:487-494.
- *Adkins B, Bu Y, Guevara P. The generation of Th memory in neonates versus adults: prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. *J Immunol* 2001; 166: 918-925.
- *Adlerberth I, Hansson LA, Wold AE. Ontogeny of the intestinal flora. In: Sanderson IR, Walker WA, eds. *Development of the gastrointestinal tract*. Ontario: BC Decker Inc., 2000.pp. 279-295.
- Aguirre, M., Collins, M.D. Lactic acid bacteria and human clinical infection. 1993 *J. Appl. Bacteriol.* 75(2):95-107.
- *Ahrné S, Lonnermark E, Wold AE, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, et al. Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microb Infect.* 2005; 7: 1256- 1262.
- *Ajslev TA, Andersen CS, Gamborg M, Sørensen TI, Jess T. Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. *Int J Obes (Lond)* 2011; 35: 522–529.
- *Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 627-633.

- *Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675-680.
- *Akré J. Alimentación infantil: bases fisiológicas. Instituto de Saúde de SaoPaulo, 1994.
- *AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; (4): CD005496.
- *AlFaleh K, Anabrees J. Efficacy and safety of probiotics in preterm infants. *J Neonatal Perinatal Med* 2013; 6:1-9.
- *Al-Lahham SH, Peppelenbosch MP, Roelofsen H, Vonk RJ, Venema K. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801: 1175-1183.
- *Allen LH. Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: an overview. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:1206S-1212S.
- *Allen SJ, Jordan S, Storey M, Thornton CA, Gravenor M, Garaiova I, et al. Dietary supplementation with lactobacilli and bifidobacteria is well tolerated and not associated with adverse events during late pregnancy and early infancy. *J Nutr* 2010; 140: 483-488.
- *Allen S J, Jordan S, Storey M, Thornton C A, Gravenor M B, Garaiova I, et al. Probiotics in the prevention of eczema: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child* 2014; 99: 1014–1019.
- *Allin KH, Nielsen T, Pedersen O. Mechanisms in endocrinology: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2015; 172: R167–R177
- *Aloisio I, Santini C, Biavati B, Dinelli G, Cencič A, Chingwaru W, et al: Characterization of *Bifidobacterium* spp. strains for the treatment of enteric disorders in newborns. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 96: 1561-1576.
- *Álvarez-Calatayud G, Pérez-Moreno J, Tolín M, Sánchez C. Aplicaciones clínicas del empleo de probióticos en pediatría. *Nutr Hosp* 2013; 28: 564-574.

- *Amir LH, Harris H, Adriske L. An audit of mastitis in the emergency department. *J Hum Lact* 1999, 15:221-224.
- *Amir LH and The Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee. ABM clinical protocol #4: mastitis, revised march 2014. *Breastfeeding Med* 2014; 9: 239-243.
- *Amir LH, Griffin L, Cullinane M, Garland SM. Probiotics and mastitis: evidenced-based marketing?. *Int Breastfeeding J* 2016; 11:19.
- *Anabrees J, Indrio F, Paes B, AlFaleh K. Probiotics for infantile colic: a systematic review. *BMC Pediatr* 2013; 13: 186.
- *Arboleya S, Salazar N, Solís G, Fernández N, Hernández-Barranco AM, Cuesta I, et al. Assessment of intestinal microbiota modulation ability of Bifidobacterium strains in in vitro fecal batch cultures from preterm neonates. *Anaerobe* 2013; 19: 9–16.
- *Arribas B, Rodríguez-Cabezas ME, Comalad, M, Bailón E, Camuesco D, Olivares M, et al. Evaluation of the preventative effects exerted by Lactobacillus fermentum in an experimental model of septic shock induced in mice. *Br J Nutr* 2008; 101: 51-58.
- *Arrieta MC, Stiemsma LT, Dimitriu PA, Thorson L, Russell S, Yurist- Doutsch S, et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci Transl Med* 2015; 7: 307ra152
- *Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 2010; 50:1551-1558.
- *Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 411-420.
- *Avall-Jääskeläinen S, Koort J, Simojoki H, Taponen S. Bovine-associated CNS species resist phagocytosis differently. *BMC Vet Res.* 2013; 9:227
- *Azad MB, Kozyrskyj AL. Perinatal programming of asthma: the role of gut microbiota. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 932072.

- *Azad MB, Coneys JG, Kozyrskyj AL, Field CJ, Ramsey CD, Becker AB, et al. Probiotic supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis *BMJ* 2013; 347:f6471.
- *Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Nat Acad Sci USA* 2007; 104: 979–984.
- *Baghdadi M, Chiba S, Yamashina T, Yoshiyama H, Jinushi M. MFG-E8 regulates the immunogenic potential of dendritic cells primed with necrotic cell-mediated inflammatory signals. *PLoS One* 2012; 7(6): e39607.
- *Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* 2013; 60: 49–74.
- *Balmer SE, Scott PH, Wharton BA. Diet and faecal flora in the newborn: casein and whey proteins. *Arch Dis Child* 1989; 64: 1678-1684.
- *Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.
- *Baró L, Jiménez J, Martínez-Férez A, Bouza JJ. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars Pharmaceutica*. 2001; 42:135-145.
- *Burton JL, Erskine RJ. Immunity and mastitis. Some new ideas for and old disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2003; 19: 1-45.
- *Bashir ME, Louie S, Shi HN, Nagler-Anderson C: Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol* 2004; 172: 6978-6987.
- *Bath SC, Steer CD, Golding J, Emmett P, Rayman MP. Effect of inadequate iodine status in UK pregnant women on cognitive outcomes in their children: results from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Lancet* 2013; 382:331–337.
- *Bayley TM, Alasmi M, Thorkelson T, Jones PJ, Corcoran J, Krug-Wispe S, et al. Longer term effects of early dietary cholesterol level on synthesis and circulating cholesterol concentrations in human infants. *Metabolism* 2002; 51:25–33.

- *Bearfield C, Oavenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *Br J Obstet Gynaecol* 2002; 109: 527-533.
- *Bercot B, Kannengiesser C, Oudin C, Grandchamp B, Sanson-le Pors MJ, et al. First description of NOD2 variant associated with defective neutrophil responses in a woman with granulomatous mastitis related to corynebacteria. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3.034-3.037.
- *Bermúdez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotics mechanism of action. *Ann Nutr Metab* 2012; 61: 160-174.
- *Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cells lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994; 35: 483-489.
- *Berni Canani R, Nocerino R, Terrin G, Coruzzo A, Cosenza L, Leone L, et al. Effect of *Lactobacillus* GG on tolerance acquisition in infants with cow's milk allergy: a randomized trial. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 580–582.
- *Berni Canani R, Nocerino R, Terrin G, Frediani T, Lucarelli S, Cosenza L, et al. Formula selection for management of children with cow milk allergy influences the rate of acquisition of tolerance: a prospective multicenter study. *J Pediatr* 2013; 163: 771–777.
- *Berni Canani R, Sangwan N, Stefka AT, Nocerino R, Paparo L, Aitoro R, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J* 2016; 10: 742-750.
- *Bertelsen RJ, Jensen ET, Ringel-Kulka T. Use of probiotics and prebiotics in infant feeding. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2016; 30: 39-48.
- *Bertotto A, Gerli R, Castellucci G, Scalise F, Vaccaro R. Human milk lymphocytes bearing the gamma/delta T-cell receptor are mostly delta TCSI-positive cells. *Immunology* 1991; 74: 360-361.

- *Bhardwaj A, Gupta H, Kapila S, Kaur G, Vij S, Malik RK. Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. *Int J Food Microbiol* 2010; 141: 156-164.
- *Biasucci G, Benenati B, Morelli L, Bessi E, Boehm G. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J Nutr* 2008; 138: 1796S–1800S.
- *Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 516-520.
- *Bode L, Kunz C, Muhly-Reinholz M, Mayer K, Seeger W, Rudloff S. Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. *Thromb Haemost* 2004; 92:1402–1410.
- *Bonaz BL, Bernstein CN. Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2013; 144: 36-49.
- *Boris S, Suárez JE, Vázquez F, Barbés C. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect Immun* 1998; 66: 1985-1989.
- *Boyle RJ, Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, Murrell DF, Tang ML. Probiotics for treating eczema. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;(4):CD006135.
- *Brenna JT, Lapillonne A. Background paper on fat and fatty acid requirements during pregnancy and lactation. *Ann Nutr Metab* 2009; 55:97–122.
- *Brines RD, Brock JH. The effect of trypsin and chymotrypsin on the in vitro antimicrobial and iron-binding properties of lactoferrin in human milk and bovine colostrums. Unusual resistance of human apolactoferrin to proteolytic digestion. *Biochem Biophys Acta* 1983; 759: 229-235.
- *Brook I. Bacterial interference. *Crit Rev Microbiol* 1999; 25:155-172. .
- *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.

- *Budunelli N, Baylas H, Budunelli E, Turkoglu O, Kiise T, Dahlen G. Periodontal infections and preterm low birth weight: a case-control study. *J Clin Periodontol* 2005; 32:174-181.
- *Butler JE, Sun J, Weber P, Navarro P, Francis D. Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology* 2000; 100: 119-130.
- *Buts JP, de Keyser N, Kolanowski J, Sokal E, Nsegiyumba T. Maturation of villus and crypt cell functions in rat small intestine: role of dietary polyamines. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 1091-1098.
- *Bust JP, de Keyser N, de Raedemaeker L, Collette E, Sokal EM. Polyamine profiles in human milk, infant artificial formulas, and semielemental diets. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 21:44-49.
- *Byers T, Graham S, Rzepka T, Marshall J. Lactation and breast cancer: evidence for a negative association in premenopausal women. *Am J Epidemiol* 1985; 121: 664- 674.
- *Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* 2012; 96: 544–551.
- *Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation. From molecular biology to the clinics. *Lipids* 2003; 38:342-352.
- *Campoy C, Escolano-Margarit MV, Anjos T, Szajewska H, Uauy R. Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *Br J Nutr* 2012; 107 (suppl 2): S85–106.
- *Cani PD, Knauf C. How gut microbes talk to organs: The role of endocrine and nervous routes.. *Mol Metab* 2016; 5: 743-752.
- *Carbonell-Estrany X, Figueras-Aloy J, Alvarez E. Erythropoietin and prematurity – where do we stand?. *J Perinat Med* 2005; 33:277–286.
- *Cárdenas N, Laiño JE, Delgado S, Jiménez E, Juárez del Valle M, Savoy de Giori G et al. Relationships between the genome and some phenotypical properties of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99(10):4343-4353.

- *Caricilli AM, Castoldi A, Câmara NO. Intestinal barrier: A gentlemen's agreement between microbiota and immunity. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014; 5: 18-32.
- *Carrera M, Arroyo R, Mediano P, Fernández L, Marín M, Rodríguez JM. Lactancia materna y mastitis. Tratamiento empírico basado en la sintomatología y los agentes etiológicos. *Acta Pediatr Esp* 2012; 70: 255-261.
- *Carver JD. Nucleótidos, *Anales de Nestlé* 1996; 54: 99-109.
- *Casadevall A, Pirofski LA. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1: 17-24.
- *Cekola PL, Czerkies LA, Storm HM, Wang MH, Roberts J, Saavedra JM. Growth and tolerance of term infants fed formula with probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Clin Pediatr (Phila)* 2015; 54: 1175-1184.
- *Centuori S, Burmaz T, Ronfani L, Fragiaco M, Quintero S, Pavan C, et al. Nipple care, sore nipples and breastfeeding: a randomized trial. *J Hum Lact* 1999; 15:125-130.
- *César JA, Victora CG, Barros FC, Santos IS, Flores JA. Impact of breast feeding on admission for pneumonia in postneonatal period in Brazil: nested case-control study. *BMJ* 1999; 318:1316-1320.
- *Chaia AP, Oliver G. Intestinal microflora and metabolic activity In: Fuller R., Perdigon G, eds. *Gut Flora, nutrition, immunity and health*. Oxford: Blackwell Publishers, 2008. pp 77-98.
- *Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 1998; 84:759-768.
- *Chau K, Lau E, Greenberg S, Jacobson S, Yazdani-Brojeni P, Verma N et al. Probiotics for infantile colic: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial investigating *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *J Pediatr* 2015; 166: 74-78.
- *Cheatham CL, Nerhammer AS, Asserhoj M, Michaelsen KF, Lauritzen L. Fish oil supplementation during lactation: effects on cognition and behavior at 7 years of age. *Lipids* 2011; 46:637-645.

- *Chichlowski M, De Lartigue G, German JB, Roybould HE, Mills DA: Bifidobacteria isolated from infants and cultured on human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 55: 321-327.
- *Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 260–270.
- *Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methé BA, Zavadil J, Li K, et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature* 2012; 488: 621–626.
- *Chouraqui JP, Grathwohl D, Labaune JM, Hascoet JM, de Montgolfier I, Leclaire M, Giarre, et al. Assessment of the safety, tolerance, and protective effect against diarrhea of infant formulas containing mixtures of probiotics or probiotics and prebiotics in a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1365-1373.
- *Chow J, Lee SM, Shen Y, Khosravi A, Mazmanian SK: Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Adv Immunol* 2010; 107: 243-274.
- *Cilla A, Lacomba R, García-Llatas G, Alegría A. Prebióticos y probióticos en alimentación infantil: revisión de la evidencia. *Nutr Hosp* 2012; 27: 1037-1048.
- *Collado MC, Delgado S, Maldonado A, Rodríguez JM. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 2009; 48:523-528.
- *Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep* 2016; 6:23129.
- *Collins SM, Bercik P. Gut microbiota: Intestinal bacteria influence brain activity in healthy humans. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013; 10: 326–327.
- *Collins SM, Bercik P. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology* 2009; 136: 2003-2014.
- *Cong X, Xu W, Romisher R, Poveda S, Forte S, Starkweather A, et al. Gut Microbiome and Infant Health: Brain-Gut-Microbiota Axis and Host Genetic Factors. *Yale J Biol Med* 2016; 89: 299-308.

- *Conner AE. Elevated levels of sodium and chloride in milk from mastitic breast. *Pediatrics* 1979; 63: 910- 911.
- *Connolly E, Abrahamsson T, Björkstén B. Safety of D(-)-lactic acid producing bacteria in the human infant. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41:489-492.
- *Contreras GA, Rodríguez JM. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011; 16: 339-356.
- *Conway, PL. Microbial ecology of the human large intestine. In: Gibson GR, Macfarlane GT, eds. *Human Colonic Bacteria: Role in nutrition, physiology, and pathology*. Boca ratón: CRC Press, 1995. pp. 1-24.
- *Coppa GV, Gabrielli O, Pierani P, Catassi C, Carlucci A, Giorgi PL. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics* 1993; 91:637-641.
- *Corrêa NB, Péret Filho LA, Penna FJ, Lima FM, Nicoli JR. A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 385-389.
- *Costeloe K, Bowler U, Brocklehurst P, Hardy P, Heal P, Juszczak E, et al. A randomised controlled trial of the probiotic *Bifidobacterium breve* BBG-001 in preterm babies to prevent sepsis, necrotising enterocolitis and death: the Probiotics in Preterm infants (PiPS) trial. *Health Technol Assess* 2016; 20: 1-194.
- *Cox LM, Blaser MJ. Antibiotics in early life and obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2015; 11: 182–190.
- *Cremonini F, Di Caro S, Nista EC, Bartolozzi F, Capelli G, Gasbarrini G, et al. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:1461-1467.
- *Cressier B, Bissonnette N. Assessment of an extraction protocol to detect the major mastitis-causing pathogens in bovine milk. *J Dairy Sci* 2011, 94: 2171-2184.
- *Crispie F, Alonso-Gómez M, O'Loughlin C, Klostermann K, Flynn J, Arkins S, et al. Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *J Dairy Res* 2008; 75: 365-373.

- *Critchfield JW, Van Hemert S, Ash M, Mulder L, Ashwood P. The potential role of probiotics in the management of childhood autism spectrum disorders. *Gastroenterol Res Pract* 2011; 2011: 161358.
- *Croucher SC, Houston AP, Bayliss CE, Turner RJ. Bacterial populations associated with different regions of the human colon wall. *Appl Environ Microbiol* 1983; 45:1025-1033.
- *Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 701–712.
- *Cummings JH, Beatty ER, Kingman SM, Bingham SA, Englyst HN. Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *Br.J Nutr* 1996; 75: 733-747.
- *Cummings JH, Macfarlane GR, Englyst HN. Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 4155-4205.
- *Dalmau Serra J, Moeno Villares JM. Leches de crecimiento en la alimentación infantil. *Acta Pediatr Esp* 2011; 69: 373-378.
- *Dalwai F, D. Spratt DA, Pratten J. Use of quantitative PCR and culture methods to characterize ecological flux in bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3072–3076
- *Dandriofosse G, Peulen O, El Khefif N, Deloyer P, Dandriofosse AC, Grandfils C. Are milk polyamines preventive agents against food allergy?. *Proc Nutr Soc* 2000; 59: 81-86.
- *Davidson LA, Lönnerdal B. Persistence of human milk proteins in the breast-fed infant. *Acta Paediatr Scan* 1987; 76: 733-740.
- *De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 14691-14696.
- *De Keersmaecker SC, Verhoeven TL, Desair J, Marchal K, Vanderleyden J, Nagy I. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 259: 89-96.

- *Delgado S, Arroyo R, Martín R, Rodríguez JM. PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infect Dis* 2008; 8:51.
- *Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (I). *Acta Pediatr Esp* 2009a; 67: 77-84.
- *Delgado S, Arroyo R, Jimenez E, Herrero E, Del Campo R, Marin M, et al. Staphylococcus epidermidis strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiol* 2009b; 9: 82.
- *Delgado-Noguera MF, Calvache JA, Bonfill Cosp X. Supplementation with long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) to breastfeeding mothers for improving child growth and development. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (12): CD007901.
- *Delplanque B, Gibson R, Koletzko B, Lapillonne A, Strandvik B. Lipid quality in infant nutrition: current knowledge and future opportunities. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015; 61: 8–17.
- *Demmers TA, Jones PJH, Wang Y, Krug S, Creutzinger V, Heubi J. Effects of early cholesterol intake on cholesterol biosynthesis and plasma lipids among infants until 18 months of age. *Pediatrics* 2005; 115:1594-1601.
- *Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Kiely B, Cryan JF, Dinan TG. Effects of the probiotic Bifidobacterium infantis in the maternal separation model of depression. *Neuroscience* 2010; 170: 1179–1188.
- *Di Mauro G, Bernardini R, Barberi S, Capuano A, Correr A, De' Angelis GL, et al. Prevention of food and airway allergy: consensus of the Italian Society of Preventive and Social Paediatrics, the Italian Society of Paediatric Allergy and Immunology, and Italian Society of Pediatrics. *World Allergy Organ J.* 2016; 9:28.
- *Díaz-Ropero MP, Martín R, Sierra S, Lara-Villoslada F, Rodríguez JM, Xaus J, Olivares M. Two lactobacillus strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune system. *J Appl Microbiol* 2007; 102:337-343.
- *Didierlaurent A, Sirard JC, Kraehenbuhl P, Neutra MR. How the gut senses its content. *Cell Microbiol* 2001; 4: 61-72.

- *DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One* 2008; 3 (8): e3056.
- *Dollberg S, Marom R, Botzer E. Lingual frenotomy for breastfeeding difficulties: a prospective follow-up study. *Breastfeed Med* 2014; 9: 286-289.
- *Domínguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 11.971-11.975.
- *Dong H, Rowland I, Tuohy KM, Thomas LV, Yaqoob P. Selective effects of *Lactobacillus casei* Shirota on T cell activation, natural killer cell activity and cytokine production. *Clin Exp Immunol* 2010; 161:378-388.
- *Dong X-D, Li X-R, Luan J-J, Liu X-F, Peng J, Luo Y-Y, et al. Bacterial communities in neonatal feces are similar to mothers' placentae. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2015; 26:90-94.
- *Dotson KD, Jerrell JP, Picciano MF, Perkins EG. High-performance liquid chromatography of human milk triacylglycerols and gas chromatography of component fatty acids. *Lipids* 1992; 27: 933-939.
- *Drossou-Agakidou V, Roilides E, Papakyriakidou-Koliouka P, Agakidis C, Nikolaidis N, Sarafidis K, et al. Use of ciprofloxacin in neonatal sepsis: lack of adverse effects up to one year. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 346-349.
- *Dunne C, O'Mahony I, Murphy I, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (2 Suppl):386S-392S.
- *Eiwegger T, Stahl B, Schmitt J, Boehm G, Gerstmayr M, Pichler J, et al. Human milk-derived oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides stimulate cytokine production of cord blood T-cells in vitro. *Pediatr Res* 2004; 56:536-540.
- *Eiwegger T, Stahl B, Haidl P, Schmitt J, Boehm G, Dehlink E, et al. Prebiotic oligosaccharides: in vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21:1179-1188.

- *El Aidy S, Dinan TG, Cryan JF. Gut microbiota: the conductor in the orchestra of immune-neuroendocrine communication. *Clin Ther* 2015; 37: 954-967.
- *Engfer MB, Stahl B, Finke B, Sawatzki G, Daniel H. Human milk oligosacharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:1589-1596.
- *Escott R. Positioning, attachment and milk transfer. *Breastfeeding Rev* 1989; 14:31-36.
- *Espínola-Docio B, Costa-Romero M, Díaz-Gómez NM, Paricio-Talayero JM. Mastitis. Puesta al día. *Arch Argent Pediatr* 2016; 114: 576-584.
- *Espinosa-Martos I, Jiménez E, de Andrés J, Rodríguez-Alcalá LM, Tavárez S, Manzano S, et al. Milk and blood biomarkers associated to the clinical efficacy of a probiotic for the treatment of infectious mastitis. *Benef Microbes* 2016; 7: 305-318.
- *ESPGHAN Committee on Nutrition. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 52: 238-250.
- *European Commission. Commission Staff Working Document. Young-child formulae: background information. Accompanying the document Report from the Commission to the European Parliament and the Council on young-child formulae {COM(2016) 169 final}. Brussels, 31.3.2016 SWD(2016) 99 final.
- *European Commission. Working Group consisting of members of the Scientific Committee on Animal Nutrition, Scientific Committee on Food and the Scientific committee on Plants of the European Commission. On a generic approach to the safety assessment of microorganisms used in feed/food and feed/food production. 2003. [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out178_en.pdf].
- *European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J* 2006; 587: 1-16.
- *European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. Technical guidance¹ Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J* 2008; 732, 1-15.

-
- *European Food Safety Authority (EFSA). Guidance on the scientific requirements for health claims related to gut and immune function. EFSA J 2011; 9: 1984.
- *European Food Safety Authority (EFSA). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA J 2012; 10: 2740
- *European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). EFSA Journal 2013; 11(11):3449.
- *European Food Safety Authority (EFSA) Panel on dietetic products, nutrition and allergies (NDA). Scientific opinion on the essential composition of infant formula and follow on formula. EFSA Journal 2014; 12(7):3760.
- *Everard A, Cani PD, (2013). Diabetes, obesity and gut microbiota. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2013; 27: 73–83.
- *Fåk F, Ahrné S, Molin G, Jeppsson B, Weström B. Microbial manipulation of the rat dam change bacterial colonization and alters properties of the gut in her offspring. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2008; 294: G148-154.
- *Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 1157-1170.
- *Fall CHD, Barker DJP, Osmond C, Winter PD, Clark PMS, Hales CN. Relation of infant feeding to adult serum cholesterol concentration and death from ischemic heart disease. BMJ 1992; 304:801-805.
- *Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2010; 51: 77-84.
- *FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, October 2001
- *FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. 2002. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.

- *Farquharson J, Jamieson EC, Abbasi KA, Patrick WJ, Logan RW, Cockburn F. Effect of diet on the fatty acid composition of the major phospholipids of infant cerebral cortex. *Arch Dis Child* 1995; 72:198– 203.
- *Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin: a multifactorial protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* 2003; 40: 395-405.
- *Favier CF, Vaughan EE, de Vos WM, Akkermans ADL. Molecular monitoring of sucesión of bacterial communities in huamn neonatos. *Appl Environm Microbiol* 2002; 68:219-226.
- *Fedorak R, Demeria D. Probiotic bacteria in the prevention and the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2012; 41: 821-842.
- *Fernández L, Langa S, Martin V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 2013; 69: 1-10.
- *Fernández L, Arroyo R, Espinosa I, Marín M, Jiménez E, Rodríguez JM. Probiotics for human lactational mastitis. *Benef Microbes* 2014; 5: 169-183.
- *Fernández L, García C, Carrera M, Mediano P, Rodríguez JM, Marín M. Factores de riesgo de la mastitis infecciosa durante la lactancia. *Acta Pediatr Esp* 2016a; 74: e243-e250.
- *Fernández L, Cárdenas N, Arroyo R, Manzano S, Jiménez E, Martín V, Rodríguez JM. Prevention of infectious matitis by oral administration of *Lactobacillus salivarius* PS2 during late pregnancy. *Clin Infect Dis* 2016b; 62:568-573.
- *Fernández MF, Boris S, Barbés C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 2003; 94:449-455.
- *Fetherston C. Risk factors for lactation mastitis. *J Hum Lact* 1998;14:101-109.
- *Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr* 2005; 135:1-4.
- *Fildes V. Putting Mum in the picture. *Nursing Mirror* 1979; 149: 22-24.

- *Fichter M, Klotz M, Hirschberg DL, Waldura B, Schofer O, Ehnert S, et al. Breast milk contains relevant neurotrophic factors and cytokines for enteric nervous system development. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55:1592–1596.
- *Forsythe P, Kunze W, J. Moody microbes or fecal phrenology: what do we know about the microbiota-gut-brain axis?. *BMC Med* 2016; 14: 58.
- *Franson GB, Lonnerdal B. Iron in human milk. *J Pediatr* 1980; 96: 380-384.
- *Frei R, Akdis M, O'Mahony L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. *Curr Opin Gastroenterol* 2015; 31: 153–158.
- *Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 2011; 469: 543-547.
- *Galland L. The gut microbiome and the brain. *J Med Food* 2014; 17: 1261–1272.
- *Ganesh BP, Versalovic J. Luminal conversion and immunoregulation by probiotics. *Front Pharmacol* 2015; 6:269.
- *Gao J, Wu H, Liu J. Importance of gut microbiota in health and diseases of new born infants. *Exp Ther Med* 2016; 12: 28-32.
- *Garcia-Ara MC, Boyano-Martinez MT, Diaz-Pena JM, MartinMunoz MF, Martin-Esteban M. Cow's milk-specific immunoglobulin E levels as predictors of clinical reactivity in the follow-up of the cow's milk allergy infants. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 866e70.
- *García-López R. Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediatr Mex* 2011; 32: 223-230.
- *Garofalo RP, Goldman AP. Expression of functional immunomodulatory and antiinflammatory factors in human milk. *Clin Perinatol* 1999; 26: 361-377.
- *Garofalo R. Cytokines in human milk. *J Pediatr* 2010; 156 (2 Suppl):S36–40.
- *Garrido D, Kim JH, German JB, Raybould HE, Mills DA. Oligosaccharide binding proteins from *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* reveal a preference for host glycans. *PLoS One* 2011; 6:e17315.

- *Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* 2014; 15, 382–392.
- *Gibberd GF. Sporadic and epidemic puerperal breast infections: a contrast in morbid anatomy and clinical signs. *Am J Obstet Gynecol* 1953; 65:1038-1041.
- *Gibson RA, Neumann MA, Makrides M. Effect of increasing breast milk docosahexaenoic acid on plasma and erythrocyte phospholipid fatty acids and neural indices of exclusively breast fed infants. *Eur J Clin Nutr* 1997; 51:578–584.
- *Gil A, Uauy R, eds. Nutritional and biological significance of dietary nucleotides and nucleic acids. Barcelona: Limpergraff-Abbott Laboratories, 1996.
- *Gil Hernández A, Sánchez Pozo A. Metabolismo de los nucleótidos. En: Gil Hernández A, dir. Tratado de Nutrición. Tomo I: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. 2ª ed. Madrid: Ed. Médica Panamericana, 2010. pp 379-204.
- *Gil-Campos M, López MA, Rodríguez-Benítez MV, Romero J, Roncero I, Linares MD, Maldonado J, et al. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1-6 months of age: a randomized controlled trial. *Pharmacol Res* 2012; 65: 231-238.
- *Gill HS. Stimulation of the immune system by lactic acid cultures. *Int Dairy J* 1998; 8: 535-544.
- *Gilliland SE, Speck ML. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food borne pathogens in associative cultures. *J Food Prot* 1977; 40: 820- 823.
- *Gillmore W, McKelvey-Martin V, Rutherford S, Strain J, Loane P, Kell M, et al. Human milk contains granulocyte colony stimulating factor. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48:222–224.
- *Giovannini M, Agostoni C, Riva E, Salvini E, Ruscitto A, Zuccotti GV, et al. A randomized prospective double blind controlled trial on effects of long-term consumption of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in pre-school children with allergic asthma and/or rhinitis. *Pediatr Res* 2007; 62: 215-220.
- *Glynn DJ, Hutchinson MR, Ingman WV. Toll-like receptor 4 regulates lipopolysaccharide-induced inflammation and lactation insufficiency in a mouse model of mastitis. *Biol Reprod* 2014; 90: 91

- *Gnoth M.J, Rudolff S, Kunz C, Kinne RK. Investigations of the in vitro transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J Biol Chem* 2001; 276: 34363-34370.
- *Goldenberg JZ, Ma SS, Saxton JD, Martzen MR, Vandvik PO, Thorlund K, et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; 31(5):CD006095.
- *Goldenberg JZ, Lytvyn L, Steurich J, Parkin P, Mahant S, Johnston BC. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 22(12):CD004827.
- *González R, Maldonado A, Martín V, Mandomando I, Fumadó V, Metzner KJ, et al. Breast milk and gut microbiota in African mothers and infants from an area of high HIV prevalence. *PLoS One* 2013; 8:e80299.
- *Goto H, Sagitani A, Ashida N, Kato S, Hirota T, Shinoda T, et al. Anti-influenza virus effect of both live and non-live *Lactobacillus acidophilus* L-92 accompanied by the activation on innate immunity. *Br J Nutr* 2013; 110: 1810- 1818.
- *Grazioso CF, Werner AL, Alling DW, Bishop PR, Buescher ES. Antiinflammatory effects of human milk on chemically induced colitis in rats. *Pediatr Res* 1997; 42: 639-643.
- *Greer FR. Vitamin K status of lactating mothers and their infants. *Acta Paediatr* 1999; 88 (Suppl):95-103.
- *Grill JP, Scheneider F, Crociani I, Ballongue I. Purification and characterization of conjugated bile salt hydrolase from *Bifidobacterium longum* BB536. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61:2577-2582.
- *Grimoud J, Durand H, de Souza S, Monsan P, Ouarné F, Theodorou V, et al. In vitro screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *Int J Food Microbiol* 2010; 144:42-50.
- *Gronlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000; 83: F186-192.

- *Grunau RE, Haley DW, Whitfield MF, Weinberg J, Yu W, Thiessen P. . Altered basal cortisol levels at 3, 6, 8 and 18 months in infants born at extremely low gestational age. *J Pediatr* 2007; 150: 151–156.
- *Gruszfeld D, Socha P. Early nutrition and health: short- and long-term outcomes. *World Rev Nutr Diet* 2013; 108: 32-39.
- *Guarino A, Ashkenazi S, Gendrel D, Lo Vecchio A, Shamir R, Szajewska H, et al. European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/ European Society for Paediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe: up date. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 59: 132-152.
- *Guarino A, Guandalini S, Lo Vecchio A. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *J Clin Gastroenterol* 2015; 49 Suppl 1: S37-S45.
- *Guarner F, Melagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-519.
- *Gueimonde M, Latinen K, Salminen S, Isolauri E. Breast milk: A Source of Bifidobacteria for Infant Gut Development and Maturation?. *Neonatology* 2007; 92:64-66.
- *Gurnida DA, Rowan AM, Idjradinata P, Muchtadi D, Sekerwana N. Association of complex lipids containing gangliosides with cognitive development of 6-month-old infants. *Early Hum Dev* 2012; 88: 595-601.
- *Gutiérrez-Castrellón P, Mora-Magaña I, Díaz-García L, Jiménez-Gutiérrez C, Ramírez-Mayán J, Solomon-Santibáñez GA. Immune response to nucleotide-supplemented infant formulae: systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr* 2007; 98 Suppl 1:64-67.
- *Gutzeit C, Magri G, Cerutti A. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol Rev* 2014; 260: 76-85.
- *Guvenc IA, Muluk NB, Mutlu FS, Eski E, Altintoprak N, Oktemer T, et al. Do probiotics have a role in the treatment of allergic rhinitis?: A comprehensive systematic review and metaanalysis. *Am J Rhinol Allergy* 2016 (en prensa).

- *Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ, Blum S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell / leucocyte co-cultures. *Gut*. 2000; 47: 79-87.
- *Hamosh M. Protective function of proteins and lipids in human milk. *Biol Neonate* 1998; 74:163-176.
- *Hahn-Zoric M, Fulconis F, Minoli I, Moro G, Carlsson B, Böttiger M, et al. Antibody response to parenteral and oral vaccines are impaired by conventional and low protein formulas as compared to breast-feeding. *Acta Paediatr Scand* 1990, 79: 1137-1142.
- *Hammami R, Fernandez B, Lacroix C, Fliss I: Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 2947-2967.
- *Hanosh M. Does infant nutrition affect adiposity and cholesterol levels in adult?. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988; 7:10-16.
- *Hansen R, Russell RK, Reiff C, Louis P, McIntosh F, Berry SH, et al. Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased *Faecalibacterium prausnitzii* and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 1913–1922.
- *Hansen R, Scott KP, Khan S, Martin JC, Berry SH, Stevenson M, et al. First-pass meconium samples from healthy term vaginally- delivered neonates: an analysis of the microbiota. *PLoS One* 2015; 10(7): e0133320.
- *Hao Q, Dong BR, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; (2): CD006895
- *Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients* 2013; 5: 1869-1912.
- *Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000a; 30:61-67.
- *Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo ACM, Grijpstra J, Knol J, Degener JE, Weiling GW. Development of 165 r RNA- based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster

and their application for enumeration of Coriobacteriaceae in human feces from volunteers of different age groups. *Appl Environ Microbiol* 2000b; 66:4523-4527.

*Hart AL, Stagg AJ, Frame M, Graffner H, Glise H, Falk P, et al. The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1383-1393.

*Hart AL, Stagg AJ, Kamm MA. Use of probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 111-119.

*Hartmann PE, Kulski JK. Changes in the composition of the mammary secretion of women after abrupt termination of breast feeding. *J Physiol (Cambridge)* 1978; 275:1-11.

*Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 535-548.

*He T, Priebe MG, Zhong Y, Huang C, Harmsen HJ, Raangs GC, et al. Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *J Appl Microbiol*. 2008; 104: 595-604.

*Hedin C, Whelan K, Lindsay JO. Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proc Nutr Soc* 2007; 66:307-315.

*Heikkilä MP, Saris PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* 2003; 95; 471-478.

*Heilig HGHJ, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans ADL, de Vos WM. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 114-123.

*Helgeland L, Vaage JT, Rolstad B, Midtvedt T, Brandtzaeg P. Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology* 1996; 89: 494- 501.

- *Hesla HM, Stenius F, Jäderlund L, Nelson R, Engstrand L, Alm J, et al. Impact of lifestyle on the gut microbiota of healthy infants and their mothers—the ALADDIN birth cohort. *FEMS Microbiol Ecol* 2014; 90: 791-801.
- *Hessle C, Andersson B, Wold AE. Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun* 2000; 68: 3581-3586.
- *Hevia A, Delgado S, Sánchez B, Margolles A. Molecular Players Involved in the Interaction Between Beneficial Bacteria and the Immune System. *Front Microbiol* 2015; 6: 1285.
- *Hojsak I, Abdovi S, Szajewska H, Milosevi M, Krznari Z, Kolacek S. *Lactobacillus GG* in the prevention of nosocomial gastrointestinal and respiratory tract infections. *Pediatrics* 2010; 125: 1171-1177.
- *Holladay SD, Smialowicz RJ. Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. *Environ Health Perspect* 2000; 108 Suppl 3: 463-473.
- *Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld IH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41:85-101.
- *Hooper LV, Xu J, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI. A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9833-9838.
- *Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292:1115-1118.
- *Hosea Blewett HJ, Cicalo MC, Holland CD, Field CJ. The immunological components of human milk. *Adv Food Nutr Res* 2008; 54:45-80.
- *Howarth GS, Wang H. Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients* 2013; 5: 58-81.
- *Hu J, Nomura Y, Bashir A, Fernandez-Hernandez H, Itzkowitz S, Pei Z, et al. Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. *PloS One* 2013; 8: e78257.

- *Huertas-Ceballos AA, Logan S, Bennett C, Macarthur C, Martin AE. Dietary interventions for recurrent abdominal pain (RAP) and irritable bowel syndrome (IBS) in childhood. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Feb 17;(2):CD003019.
- *Hunt KM, Williams JE, Shafii B, Hunt MK, Behre R, Ting R, et al. Mastitis is associated with increased free fatty acids, somatic cell count, and interleukin-8 concentrations in human milk. *Breastfeeding Med* 2013; 8:105-110.
- *Hurley WL, Theil PK. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients* 2011; 3:442–474.
- *Hurtado JA, Maldonado-Lobon JA, Díaz-Ropero MP, Flores-Rojas K, Uberos J, Leante JL, et al. Oral Administration to Nursing Women of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 Prevents Lactational Mastitis Development: A Randomized Controlled Trial. *Breastfeeding Med* 2017;
DOI: 10.1089/bfm.2016.0173
- *Hutchens TW, Henry IF, Yip TT. Origin of intact lactoferrin and its DNA-binding fragments found in the urine of human-milk preterm infants. Evaluation by stable isotopic enrichment. *Pediatr Res.* 1991; 29: 243-250.
- *Ichikawa M, Sugita M, Takahashi M, Satomi M, Takeshita T, Araki T, et al. Breast milk macrophages spontaneously produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and differentiate into dendritic cells in the presence of exogenous interleukin-4 alone. *Immunology* 2003; 108:189–195.
- *Iliev ID, Matteoli G, Rescigno M. The yin and yang of intestinal epithelial cells in controlling dendritic cell function. *J Exp Med* 2007; 204: 2253-2257.
- *Illingworth RS, Stone DG. Self-demand feeding in a maternity Unit. *Lancet* 1952; I: 683-687.
- *Inch S, Fisher C. Mastitis: infection or inflammation? *Practitioner* 1995; 239 472-476.
- *Infante-Pina D, Badia-Llach X, Ariño-Armengol B, Villegas-Iglesias V. Prevalence values in formula-fed infants. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 248-254.
- *Ingelman-Sundberg A. Early puerperal breast engorgement. *Acta Paediatr Scand* 1958; 32:399-402.

- *Innis SM. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* 2007; 137:855–859.
- *Innis SM. Dietary triacylglycerol structure and its role in infant nutrition. *Adv Nutr* 2011; 2:275–283.
- *Innis SM. Maternal nutrition, genetics and human milk lipids. *Curr Nutr Rep* 2013; 2:151–158.
- *Innis SM. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. *Am J Clin Nutr* 2014; 99 (suppl): 734S–741S
- *Ishibashi N, Yamazaki S. Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 465-470.
- *Islam SU. Clinical uses of probiotics. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95: e2658.
- *Isolauri E, Rautava S, Salminen S. Probiotics in the development and treatment of allergic disease. *Gastroenterol Clin N Am* 2012; 41: 747-762.
- *Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16: 637-46
- *Jarry A, Cerf-Bensussan N, Brousse N, Selz F, Guy-Grand D. Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur J Immunol* 1990; 20: 1097-1103.
- *Jensen CL, Voigt RG, Prager TC, Zou YL, Fraley JK, Rozelle JC, et al. Effects of maternal docosahexaenoic acid intake on visual function and neurodevelopment in breastfed term infants. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:125–132.
- *Jensen CL, Voigt RG, Llorente AM, Peters SU, Prager TC, Zou YL, et al. Effects of early maternal docosahexaenoic acid intake on neuropsychological status and visual acuity at five years of age of breast-fed term infants. *J Pediatr* 2010; 157:900–905.
- *Jenssen H. Anti herpes simplex virus activity of lactoferrin/lactoferricin -- an example of antiviral activity of antimicrobial protein/peptide. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:3002-3013.

- *Jeong K, Nguyen V, Kin J. Human milk oligosaccharides: the novel modulation of intestinal microbiota. *BMB Rep* 2012; 45: 433-441.
- *Jeurink PV, van Esch BCAM, Rijnierse A, Garssen J, Knippels LMJ. Mechanisms underlying immune effects of dietary oligosaccharides. *Am J Clin Nutr* 2013; 98 (suppl):572S–577S.
- *Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, et al. Isolation of comensal bacteria from cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 2005; 51: 270-274.
- *Jiménez E, Fernández L, Maldonado A, Martín R, Olivares M, Xaus J, Rodríguez J.M. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 4650-4655.
- *Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol* 2008a; 159: 187-193.
- *Jiménez E, Delgado S, Arroyo R, Fernandez L, Rodriguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (II). *Acta Pediatr Esp* 2009; 67: 125-132
- *Jiménez E, Langa S, Martín V, Arroyo R, Martín R, Fernández L, Rodríguez JM. Complete genome sequence of *Lactobacillus fermentum* CECT5716, a probiotic strain isolated from human milk. *J Bacteriol* 2010; 192: 4800
- *Jiménez E, de Andrés J, Manrique M, Pareja-Tobes P, Tobes R, Martínez-Blanch JF, et al. Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-suffering women. *J Hum Lact* 2015; 31: 406-415.
- *Johnston BC, Ma SS, Goldenberg JZ, Thorlund K, Vandvik PO, Loeb M, et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2012; 157: 878-888.
- *Jolles P, Levy-Toledano S, Fiat AM y col. Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from α -casein on platelet function. *Eur J Biochem* 1986, 158: 379-382.
- *Jones ML, Tomaro-Duchesneau C, Prakash S. The gut microbiome, probiotics, bile acids axis, and human health. *Trends Microbiol* 2014; 22: 306-308.

- *Jones RM. The influence of the gut microbiota on host physiology: In pursuit of mechanisms. *Yale J Biol Med* 2016; 89: 285-297.
- *Jonkers D, Penders J, Masclee A, Pierik M. Probiotics in the management of inflammatory bowel disease. A systematic review of intervention studies in adult patients. *Drugs* 2012; 72: 803-823.
- *Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br J Nutr* 2013; 110:1253–1262.
- *Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskimen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 1076-1079.
- *Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361:1869-1871.
- *Kaplan JL, Shi HN, Walker WA: The role of microbes in developmental immunologic programming. *Pediatr Res* 2011; 69: 465-472.
- *Karlsson H, Hessel C, Rudin A. Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. *Infect Immun* 2002; 70: 6688-6696.
- *Karlsson H, Larsson P, Wold AE, Rudin A. Pattern of cytokine responses to gram-positive and gram-negative commensal bacteria is profoundly changed when monocytes differentiate into dendritic cells. *Infect Immun* 2004; 72: 2671-2678.
- *Khailova L, Dvorak K, Arganbright KM, Williams CS, Halpern MD, Dvorak B. Changes in hepatic cell junctions structure during experimental necrotizing enterocolitis: effect of EGF treatment. *Pediatr Res* 2009; 66:140–144.
- *Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG. Role of gut microbiota in the aetiology of obesity: proposed mechanisms and review of the literature. *J Obes* 2016; 2016:7353642
- *Kim SO, Ah YM, Yu YM, Choi KH, Shin WG, Lee JY. Effects of probiotics for the treatment of atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014; 113: 217–226.

- *Kim WS, Ohashi M, Tanaka T; Kumura H, Kim GY, Kwon IK, et al. Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Biometals* 2004; 17:279-283.
- *Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L, Collado MC, Martinez-Costa C. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *J Perinatol* 2014; 34:599–605.
- *Klare I, Konstabel C, Werner G, Huys G, Vankerckhoven V, Kahlmeter G, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 900-912.
- *Kling PJ, Willeitner A, Dvorak B, Blohowiak SE. Enteral erythropoietin and iron stimulate erythropoiesis in suckling rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46:202–207.
- *Klostermann K, Crispie F, Flynn J, Ross RP, Hill C, Meaney W. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *J Dairy Res* 2008; 75: 365-373.
- *Koletzco B, Rodriguez-Palmero M. Polyunsaturated fatty acids in human milk and their role in early infant development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4: 269-284.
- *Kolho KL, Korpela K, Jaakkola T, Pichai MV, Zoetendal EG, Salonen A, et al. Fecal Microbiota in Pediatric Inflammatory Bowel Disease and Its Relation to Inflammation. *Am J Gastroenterol* 2015; 110: 921–930.
- *Koo WW, Hockman EM, Dow M. Palm olein in the fat blend of infant formulas: effect on the intestinal absorption of calcium and fat, and bone mineralization. *J Am Coll Nutr* 2006; 25: 117-122.
- *Kopp MV, Hennemuth I, Heinzmann A, Urbanek R. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of *Lactobacillus GG* supplementation. *Pediatrics* 2008; 121:e850-856.
- *Korterink JJ, Ockeloen L, Benninga MA, Tabbers MM, Hilbink M, Deckers-Kocken JM. Probiotics for childhood functional gastrointestinal disorders: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* 2014; 103: 365-372

- *Kotzamanidis C, Kourelis A, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N, Yiangou M. Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains. *Int J Food Microbiol* 2010; 140:154-163
- *Kritz-Silverstein D, Barret-Connor E, Hollenbach KA. Pregnancy and lactation as determinants of bone mineral density in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 1992; 136: 1052-1059.
- *Kruis W, Frick P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B, Kascák M, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004; 53: 1617-1623.
- *Kuitunen M, Kukkonen K, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, et al. Probiotics prevent IgE-associated allergy until age 5 years in cesarean-delivered children but not in the total cohort. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 335-341.
- *Kunz C, Rudloff S. Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr* 1993; 82:903-912.
- *Kusunoki R, Ishihara S, Aziz M, Oka A, Tada Y, Kinoshita Y. Roles of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in intestinal inflammation. *Digestion* 2012; 85:103–107.
- *Kvist LJ, Larsson BW, Hall-Lord ML, Steen A, Schalén C. The role of bacteria in lactational mastitis and some considerations of the use of antibiotic treatment. *Int Breastfeed J* 2008; 3: 6.
- *Lahuerta J, Smith BA, Martínez-Lage JM. An adaptation of the McGill Pain Questionnaire to the Spanish language. *Smerz* 1082; 3: 132-134.
- *Lama More RG, Gil-Alberdi González B. Efecto de la suplementación dietética con nucleótidos sobre la diarrea en el lactante sano. *An Esp Pediatr* 1998; 48: 371-375.
- *Lamberti LM, Walker CLF, Noiman A, Victora C, Black RE. Breastfeeding and the risk for diarrhea morbidity and mortality. *BMC Public Health* 2011; 11(Supp. 3): S15.
- *Langhendries JP, Detry J, van Hees J, Lambray JM, Darimont J, Mozin M, et al. Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the faecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 21: 177-181.

- *Laparra JM, Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol Res* 2010; 6: 219-225.
- *Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, Rodríguez JM, Boza J, Xaus J. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br J Nutr* 2007a; 98 (Suppl 1): S96-S100.
- *Lara-Villoslada F, Sierra S, Díaz-Ropero MP, Olivares M, Xaus J. Safety assessment of the human milk-isolated probiotic *Lactobacillus salivarius* CECT5713. *J Dairy Sci* 2007b; 90: 3583-3589.
- *Lara-Villoslada F, Sierra S, Díaz-Ropero MP, Rodríguez JM, Xaus J, Olivares M. Safety assessment of *Lactobacillus fermentum* CECT5716, a probiotic strain isolated from human milk. *J Dairy Res* 2009; 76: 216-221.
- *Laroia S, Martin JH. Bifidobacteria as possible dietary adjuncts in cultured dairy products: A review. *Cult Dairy Prod J* 1990, 25: 18-22.
- *Larqué E, Sabater-Molina M, Zamora S. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition* 2007; 23: 87-95.
- *Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 2010; 5:e9085
- *Lattka E, Rzehak P, Szabo E, Jakobik V, Weck M, Weyermann M, et al. Genetic variants in the FADS gene cluster are associated with arachidonic acid concentrations of human breast milk at 1.5 and 6 mo postpartum and influence the course of milk dodecanoic, tetracosenoic, and trans-9 octadecenoic acid concentrations over the duration of lactation. *Am J Clin Nutr* 2011; 93:382–391.
- *Lauwers J, Shinskie D. *Counselling the nursing mother: a lactation consultant's guide*, 3rd ed. Boston, Jones and Bartlett, 2000.
- *Lawrence PB. Breast milk: best source of nutrition for term and preterm infants. *Pediatr Clin North Am* 1994, 41: 925-941.

- *Lawrence RA, Lawrence RM. Lactancia Materna. Una guía para la profesión médica. 6ª ed. Madrid: Elsevier; 2007
- *Lawrence RM, Pane CA. Human breast milk: Current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health* 2007; 37:7-36.
- *Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013; 500: 541–546.
- *Lee J, Seto D, Bielory L. Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 11: 116-121.
- *Lefrançois L, Puddington L. Intestinal and pulmonary mucosal T cells: local heroes fight to maintain the status quo. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 681-704.
- *Lešková E, Kubíková J, Kováčiková E, Košická M, Porubská J, Holčíková K. Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *J Food Comp Anal* 2006 19: 252-276.
- *Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JL. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444:1022-1023.
- *Li R, Xia W, Zhang Z, Wu K. S100B protein, brain-derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor in human milk. *PLoS One* 2011; 6(6): e21663.
- *Lievin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Nesser JR, Servin AL. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000; 47:646-652.
- *Liu B, Yu Z, Chen C, Kling DE, Newburg DS. Human milk mucin 1 and mucin 4 inhibit *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion of human intestinal epithelial cells in vitro. *J Nutr* 2012; 142:1504–1509.
- *Livingstone VH, Stringer LJ. The treatment of *Staphylococcus Aureus* infected sore nipples: a randomized comparative study. *J Hum Lact* 1999, 15:241-246.

- *Lionetti E, Indrio F, Pavone L, Borrelli G, Cavallo L, Francavilla R. Role of probiotics in pediatric patients with *Helicobacter pylori* infection: a comprehensive review of the literature. *Helicobacter*. 2010; 15: 79-87.
- *Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr* 2003a; 77:1537S-1543S.
- *Lönnerdal B, Lien EL. Nutritional and physiologic significance of alpha-Lactalbumin in infants. *Nutr Rev* 2003b; 61:295-305.
- *Lönnerdal B. Nutritional roles of lactoferrin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009a; 12:293-297.
- *Lönnerdal B, Kelleher SL. Micronutrient transfer: infant absorption. *Adv Exp Med Biol* 2009b; 639:29-40.
- *Lönnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *J Pediatr* 2010; 156 (Suppl 2):S26-30.
- *Lönnerdal B. Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *Am J Clin Nutr* 2014a; 99(suppl):712S–717S.
- *López Álvarez MJ. Proteins in human milk. *Breastfeed Rev* 2007; 15:5-16.
- *López-Huertas E. Safety and efficacy of human breast milk *Lactobacillus fermentum* CECT 5716. A mini-review of studies with infant formulae. *Benef Microbes* 2015; 6: 219-224.
- *López-López A, López-Sabater MC, Campoy-Folgozo C, Rivero-Urgell M, Castaellote-BVargallo AI. Fatty acid and sn-2 fatty acid composition in human milk from Granada (Spain) in infant formulas. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56: 1242-1254.
- *López Moriana C, Mach N. Influencia de la gestación, el parto y el tipo de lactancia sobre la microbiota intestinal del neonato. *Acta Pediatr Esp* 2014; 72: 37-44.
- *Loui A, Eilers E, Strauss E, Pohl-Schickinger A, Obladen M, Koehne P. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF Receptor 1 (Sflt-1) levels in early and mature human milk from mothers of preterm versus term infants. *J Hum Lact* 2012; 28:522-528.

- *Lundeen SG, Savage DC. Characterization and purification of bile salt hydrolase from *Lactobacillus* sp. Strain 100-100. *J Bacteriol* 1990; 172: 4171-4177.
- *Luoto R, Kalliomäki M, Laitinen K, Isolauri E. The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity: follow-up study from birth to 10 years. *Int J Obes (Lond)* 2010; 34: 1531-1537.
- *MacFie J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. *Br Med Bull* 2004; 71: 1-11.
- *Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 1035S-1045S.
- *Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004a; 303: 1662-1665.
- *Macpherson AJ, Harris, N.L. Interaction between comensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004b; 4:478-485.
- *Magalhaes JG, Tattoli I, Girardin SE. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol* 2007; 19: 106-115.
- *Mai V, Draganov PV. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 81-85.
- *Makrides M, Neumann MA, Byard RW, Simmer K, Gibson RA. Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula- fed infants. *Am J Clin Nutr* 1994; 60:189–194.
- *Makrides M, Smithers LG, Gibson RA. Role of long-chain polyunsaturated fatty acids in neurodevelopment and growth. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2010; 65:123–133
- *Maldonado Lozano J, Gil Campos M, Lara Villoslada F. Nutrición del lactante. *En: Gil Hernández A, ed. Tratado de Nutrición. 2ª ed. Tomo III. Nutrición Humana en el Estado de Salud. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2010a. pp. 207-226.*

- *Maldonado J, Lara-Villoslada F, Sierra S, Sempere L, Gómez M, Rodríguez JM, et al. Safety and tolerance of the human milk probiotic strain *Lactobacillus salivarius* CECT5713 in 6-month-old children. *Nutrition* 2010b; 26: 1082-1087.
- *Maldonado J, Cañabate F, Sempere L, Vela F, Sánchez AR, Narbona E, et al. Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54:55-61.
- *Maldonado Lozano J. Nuevos ingredientes en las fórmulas para lactantes nacidos a término (I): Probióticos, prebióticos y simbióticos. *Acta Pediatr Esp* 2014a; 72: 56-62.
- *Maldonado Lozano J. Nuevos ingredientes en las fórmulas para lactantes nacidos a término (II): nucleótidos, poliaminas, lactoferrina bovina, gangliósidos, β -palmitato y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. *Acta Pediatr Esp* 2014b; 72: 93-99.
- *Maldonado Lozano J, Lara Villoslada F. Probióticos. En: Sierra Salinas C, ed. Errores en nutrición infantil. Majadahonda (Madrid): Ed Ergón, 2014c. pp 199-207.
- *Malinen E, Kassinen A, Rinttilä T, Palva A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5' nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 2003; 149: 269-277.
- *Malowski KM, Vieira AT, Ng A, Kramich J, Siervo F, Yu D et al. Regulation of anti-inflammatory response by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR 43. *Nature* 2009; 461: 182-186.
- *Marianelli C, Cifani N, Pasquali P. Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Res Microbiol* 2010; 161:673-680.
- *Marteau P, Minekus M, Havenaar R, Huis in't Veld JH. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci* 1997; 80:1031-1037.
- *Martin R, Langa S, Reiviriego C, Jiménez C, Martín ML, Xaus J, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 2003; 143: 754-758.

- *Martín R, Langa S, Reivierngo C, Jiménez, E, Marín ML, Olivares M, et al. The comensal microflora of human milk: new perspectivas for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci Tech* 2004; 15: 121-127.
- *Martín R, Olivares M, Marin ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. Probiotic potential of 3 Lactobacilli strains isolated from breast milk. *J Hum Lact* 2005; 21:8-17.
- *Martín R, Heilig GH, Zoetendal EG, Smidt H, Rodríguez JM. Diversity oft he Lactobacillus group in breast milk and vagina of healthy women and potencial role in colonization of the infant gut. *J Appl Microbiol* 2007; 103: 2638-2644.
- *Martineau F, Picard FJ, Ke D, Paradis S, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2541–2547
- *Martínez MA, López S, Arias CF, Isa P. Gangliosides have a functional role during rotavirus cell entry. *J Virol.* 2013; 87:1115-1122.
- *Martínez V, Moreno-Villares JM. Lactancia artificial. En: Moro Serrano M, Málaga Guerrero S, Madero López L, eds. *Tratado de Pediatría. Tomo I. 11ª ed.* Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2014. pp1043-1046.
- *Martínez-Augustin O, Boza JJ, del Pino JL, Lucena J, Martínez-Valverde A, Gil A. Dietary nucleotides might influence the humoral immune response against cow´s milk proteins in preterm neonates. *Biol Neonate* 1997; 71:215-223.
- *Martinez-Cañavate A, Sierra S, Lara-Villoslada F, Romero J, Maldonado J, Boza J, et al. A probiotic dairy product containing *L. gasseri* CECT574 and *L. coroniformis* CECT 5711 induces beneficial immunological changes in children suffering from allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2009; 20: 592-600.
- *Martínez-Férez A. Obtención de oligosacáridos de leche de diferentes especies por tecnología de membranas. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 2004.

- *Martins FS, Silva AA, Vieira AT, Barbosa FH, Arantes RM, Teixeira MM, et al. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. *Arch Microbiol* 2009; 191: 623-630.
- *Masaitis NS, Kaempf JW. Developing a frenotomy policy at one medical center: a case study approach. *J Hum Lact* 1996; 12:229-232.
- *Mataix J, López-Frías M. Lactación. En: Mataix J, ed. *Nutrición y alimentación humana*. 2ª ed. Majadahonda (Madrid): Ergón; 2009. pp 1085 –1100.
- *Matheson I, Aursnes I, Horgen M, Aabø O, Melby K. Bacteriological findings and clinical symptoms in relation to clinical outcome in puerperal mastitis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1988; 67:723-726.
- *Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria —a review. *Int J Food Microbiol* 2005; 105: 281-295.
- *Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human faeces. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5445-5451.
- *Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R. Use of 16S rRNA genotargeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 7220-7228.
- *Matsumiya Y, Kato N, Watanabe K, Kato H. Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborns infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Infect Chemother* 2002; 8: 43-49.
- *Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol* 2015; 37: 47-55.
- *Mayer EA, Savidge T, Shulman RJ. Brain-gut microbiome interactions and functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2014; 146: 1500-1512.
- *Mayer EA, Tillisch K, Gupta A. Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest* 2015; 125: 926–938.

- *Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL: A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008; 453: 620-625.
- *McFarland LV. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol.* 2006; 101: 812-822.
- *McFarland LV. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Med Infect Dis* 2007; 5:97-105.
- *McFarland LV, Dublin S. Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2008; 14:2650–2661.
- *McGuire MK, McGuire MA. Human milk: mother nature's prototypical probiotic food?. *Adv Nutr* 2015; 6:112–123.
- *McJarrow P, Schnell N, Jumpsen J, Clandinin T. Influence of dietary gangliosides on neonatal brain development. *Nutr Rev* 2009; 67: 451-463.
- *McVeagh P, Miller JB. Human milk oligosaccharides: only the breast. *J. Pediatr. Child. Health.* 1997; 33: 281-86.
- *Mediano P, Fernández L, Rodríguez JM, Marión M. Case-control study of risk factor for infectious mastitis in Spanish breastfeeding women. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2014; 14: 195.
- *Medzhitov R: Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 135-145.
- *Melzack R. The McGill Pain Questionnaire. *Pain* 1975; 1: 277-299.
- *Melzack R. The short-form McGill Pain Questionnaire: Major properties and scoring methods. *Pain* 1987; 30: 191-197.
- *Miele E, Pascarella F, Giannetti E, Quaglietta L, Baldassano RN, Staiano A. Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2009; 104: 437–443.

- *Milani C, Mancabelli L, Lugli GA, Duranti S, Turrone F, Ferrario C, et al. Exploring vertical transmission of bifidobacteria from mother to child. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81:7078 –7087.
- *Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes (Lond)* 2012; 36: 817-825.
- *Million M, Angelakis E, Maraninchi M, Henry M, Giorgi R, Valero R, et al. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int J Obes (Lond)* 2013; 37: 1460-1466.
- *Mizuno K, Hatsuno M, Aikawa K, Takeichi H, Himi T, Kaneko A, et al. Mastitis is associated with IL-6 Levels and milk fat globule size in breast milk. *J Hum Lact* 2012; 28:529-534.
- *Moazzez A, Kelso RL, Towfigh S, Sohn H, Berne TV, Mason RJ. Breast abscess bacteriologic features in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemics. *Arch Surg* 2007; 142: 881-884.
- *Molloy MJ, Bouladoux N, Belkaid Y: Intestinal microbiota: shaping local and systemic immune responses. *Semin Immunol* 2012; 24 :58-66.
- *Montgomery TL, Wise RI, Lang WR, Mandle RJ, Fritz M. A study of staphylococcal colonization of postpartum mothers and newborn infants. Comparison of central care and rooming-in. *A J Obstet Gynecol* 1959; 78:1227-1233.
- *Montiel-Castro AJ, González-Cervantes RM, Bravo-Ruiseco G, Pacheco-López G. The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Front Integr Neurosci* 2013; 7:70.
- *Moreau MC, Ducluzeau R, Guy-Grand D, Muller MC. Increase in the population of duodenal IgA plasmocytes in axenic mice monoassociated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. *Infect Immun* 1978; 21: 532-539.
- *Moreno Villares JM. Prebióticos en las fórmulas para lactantes. ¿Podemos modificar la respuesta inmune? *An Pediatr (Barc)* 2008; 68: 286-294.

- *Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803
- *Mugambi M, Musekiwa A, Lombard M, Young T, Blaauw R. Synbiotics, probiotics or prebiotics in infant formula for full term infants: a systematic review. *Nutrition Journal* 2012; 11:81.
- *Muñoz-Quesada S, Chenoll E, Vieites JM, Genovés S, Maldonado J, Bermúdez-Brito M, et al. Isolation, identification and characterization of the novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. *Br J Nutr* 2012; 109: S51-S62
- *Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona F, Soriguer F, et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Med* 2013; 11: 46.
- *Naarding MA, Ludwig IS, Groot F, Berkhout B, Geijtenbeek TB, Pollakis G, et al. Lewis X component in human milk binds DCSIGN and inhibits HIV-1 transfer to CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* 2005; 115:3256–3264.
- *Nagengast FM, Grubben MJ, van Munster IP. Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1067-1070.
- *Naidu AS, Arnold RR. Influence of lactoferrin on host-microbe interactions. In: Hutchens TW, Lonnerdal B, eds. *Lactoferrin: interaction and biological composition*. Humana Press, 1997. pp. 259-275.
- *Nakhla T, Fu D, Zopf D, Brodsky NL, Hurt H. Neutral oligosaccharide content of preterm human milk. *Br J Nutr* 1999; 82:361–367.
- *Narbona López E, Uberos Fernández J, Armadá Maresca MI, Couce Pico ML, Rodríguez Martínez G, Saenz de Pipaon M. Grupo de Nutrición y Metabolismo Neonatal, Sociedad Española de Neonatología: recomendaciones y evidencias para la suplementación dietética con probióticos en recién nacidos de muy bajo peso al nacer. *An Pediatr (Barc)* 2014; 81:397.e1-397.e8
- *Nascimento MBR, Issler H. Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns. *Rev Hosp Clín Fac Med S Paulo* 2003; 58:47-60.

- *NASPGHAN Nutrition Report Committee, Michail S, Sylvester F, Fuchs G, Issenman R. Clinical efficacy of probióticos: review of the evidence with focus on children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43: 550-557.
- *Navarro J, Maldonado J, Narbona E, Ruiz-Bravo A, García-Salmerón JL, Molina A et al. Influence of dietary nucleotides on plasma immunoglobulins and lymphocyte subsets of preterm infants. *Biofactors* 1999; 10: 67-76.
- *Neutra M R. Current Concepts in Mucosal Immunity V. Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. *Am J Physiol* 1998; 274: 785-791.
- *Neville MC, Morton J. Physiology and endocrine changes underlying human lactogenesis II. *J Nutr* 2001; 131: 3005S-3008S.
- *Newburg SN, Neubauer SH. Carbohydrates in milk; analysis, quantities and significance. In: Jensen RG ed. *Handbook in milk composition*. New York: Academic Press, 1995; pp 273-350.
- *Newburg D, Peterson J, Ruiz-Palacios G, Matson D, Morrow A, Shults J, et al. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet* 1998; 351: 1160–1164.
- *Newburg DS. Innate immunity and human milk. *J Nutr* 2005; 135: 1308-1312.
- *Newburg DS, Walker WA. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr Res* 2007; 61:2-8.
- *Newburg DS, Woo JG, Morrow AL. Characteristics and potential functions of human milk adiponectin. *J Pediatr* 2010; 156:S41–S46.
- *Nicholson W, Yuen HP. A study of breastfeeding rates at a large Australian obstetric hospital. *Aust NZ J Obstet Gynaecol*, 1995, 35:393-397.
- *Nikniaz L, Ostadrahimi A, Mahdavi R, Hejazi MA, Salekdeh GH. Effects of synbiotic supplementation on breast milk levels of IgA, TGF- β 1, and TGF- β 2. *J Hum Lact* 2013; 29: 591-596.
- *Nooh MM, El-Gengehi N, Kansal R, David CS, Kotb M. A transgenic mice provide evidence for a direct and dominant role of HLA class II variation streptococcal sepsis. *J Immunol* 2007; 178: 3076-3083.

- *Noverr M, Huffnagle GB. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut?. *Trends Microbiol* 2004; 12: 562-568.
- *Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O. Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Front Microbiol* 2016; 7:1031.
- *Oddy WH, Mori TA, Huang RC, Marsh JA, Pennell CE, Chivers PT, et al. Early infant feeding and adiposity risk: from infancy to adulthood. *Ann Nutr Metab* 2014; 64: 262-270.
- *Ojetti V, Gigante G, Gabrielli M, Ainora ME, Mannocci A, Lauritano EC, et al. The effect of oral supplementation with *Lactobacillus reuteri* or tilactase in lactose intolerant patients: randomized trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010; 14: 163-170.
- *O'Keefe SJ. Nutrition and colonic health: the critical role of the microbiota. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 51-58.
- *O'Keefe SJ, Ou J, Aufreiter S, O'Connor D, Sharma S, Sepulveda J, et al. Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *J Nutr* 2009; 139: 2044-2048.
- *Olivares M, Díaz-Ropero MP, Martin R, Rodríguez JM, Xaus J. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol* 2006; 101: 72-79.
- *Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S, Lara-Villoslada F, Fonollá J, Navas M, et al. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* 2007; 23:254-260.
- *Olivares M, Lara-Villoslada F, Sierra S, Boza J, Xaus J. Efectos beneficiosos de los probióticos de la leche materna. *Acta Pediatr Esp* 2008; 66: 130-134.
- *Olsen R, Greisen G, Schrøder M, Brok J. Prophylactic probiotics for preterm infants: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Neonatology* 2016; 109: 105-112
- *O'Mahony SM, Marchesi JR, Scully P, Codling C, Ceolho AM, Quigley EM, et al. Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biol Psychiatry* 2009; 65: 263–267.

- *Opri F. Mammary mycoses. *Chemotherapy* 1982; 28(Suppl 1):61-65.
- *Organización Mundial de la Salud. Consejería en lactancia materna: Curso de capacitación. Ginebra, 1993.
- *Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial para la alimentación del lactante y del niño pequeño. A54/INF.DOC./4. 1 de mayo de 2001.
- *Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals* 2004; 17:189-196.
- *Osborn DA, Sinn JKH. Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; (4): CD006475.
- *O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R, Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infection. *Sci Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 49-79.
- *Owen CG, Whincup PH, Odoki K, Gilg JA, Cook DG. Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics* 2002; 110:597-608.
- *Owen CG, Whincup PH, Kaye SJ, Martin RM, Davey Smith G, Cook DG, et al. Does initial breast feeding lead to lower blood cholesterol in adult life?. A quantitative review of the evidence. *Am J Clin Nutr* 2008; 88:305-314.
- *Ozbas ZY, Aytac S.A. Behaviour of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in yogurt made with probiotic bacteria *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft*. 1995, 50: 626-629.
- *Pan XL, Izumi T. Variation of the ganglioside compositions of human milk, cow's milk, and infant formulas. *Early Hum Dev* 2000; 57: 25-31.
- *Pandey PK, Verma P, Kumar H, Bavdekar A, Patole MS, Shouche YS. Comparative analysis of fecal microflora of healthy full-term Indian infants born with different methods of delivery (vaginal vs cesarean): *Acinetobacter* sp. Prevalence in vaginally born infants. *J Biosci*. 2012; 37: 989-998.

- *Papa E, Docktor M, Smillie C, Weber S, Preheim SP, Gevers D, et al. Non-invasive mapping of the gastrointestinal microbiota identifies children with inflammatory bowel disease. *PLoS One* 2012; 7: e39242
- *Pärty A, Lehtonen L, Kalliomäki M, Salminen S, Isolauri E. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG therapy and microbiological programming in infantile colic: a randomized, controlled trial. *Pediatr Res* 2015; 78: 470-475.
- *Patel A, Shah N, Prajapati JB. Clinical application of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection--a brief review. *J Microbiol Immunol Infect.* 2014; 47: 429-423.
- *Paviour S, Musaad S, Roberts S, Taylor G, Taylor S, Shore K, et al. *Corynebacterium* species isolated from patients with mastitis. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1.434-1.440.
- *Pelucchi C, Chatenoud L, Turati F, Galeone C, Moja L, Bach JF, et al. Probiotics supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis. *Epidemiology* 2012; 23: 402-414.
- *Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118: 511-521.
- *Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Diaz-Ropero MP, et a. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5185-5192.
- *Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Adrio JL, et al. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 737-746.
- *Peran L, Sierra S, Comalada M, Lara-Villoslada F, Bailón E, Nieto A, et al. A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Br J Nutr* 2007; 97: 96-103.
- *Perez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 2007; 119:e724-732.

- *Pérez-Cano FJ, Dong H, Yaqoob P. In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology* 2010; 215: 996-1004.
- *Petra AI, Panagiotidou S, Hatziagelaki E, Stewart JM, Conti P, Theoharides TC. Gut-microbiota-brain axis and its effect on neuropsychiatric disorders with suspected immune dysregulation. *Clin Ther* 2015; 37: 984-995.
- *Picaud JC, Chapalain V, Paineau D, Zourabichvili O, Bornet FR, Duhamel JF. Incidence of infectious diseases in infants fed follow-on formula containing synbiotics: an observational study. *Acta Paediatr* 2010; 99: 1695-1700.
- *Picciano MF. Human milk: nutritional aspects of a dynamic food. *Biol Neonate* 1998; 74: 84-93.
- *Pickering LK, Granoff DM, Erickson JR, Masor ML, Cordle CT, Schaller JP, et al. Modulation of the immune system by human milk and infant formula containing nucleotides. *Pediatrics* 1998; 101: 242-249.
- *Pirofski LA, Casadevall A. What is a pathogen? A question that begs the point. *BMC Biol* 2012; 10: 6.
- *Pittard WB, Anderson DM, Cerutti ER, Boxerbaum B. Bacteriostatic qualities of human milk. *J Pediatr* 1985; 107:240-243.
- *Preising J, Philippe D, Gleinser M, Wei H, Blum S, Eikmanns BJ, et al. Selection of bifidobacteria based on adhesion and anti-inflammatory capacity in vitro for amelioration of murine colitis. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76:3048-3051.
- *Prentice A, Prentice AM. Unilateral breast dysfunction in lactating Gambian women. *Ann Trop Paediatr* 1984, 4:19-23.
- *Prescott SL, Björkstén B. Probiotics for the prevention or treatment of allergy diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 10: 255-262.

- *Prescott SL, Wickens K, Westcott L, Jung W, Currie H, Black PN, et al. Supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* or *Bifidobacterium lactis* probiotics in pregnancy increases cord blood interferon-gamma and breast milk transforming growth factor-beta and immunoglobulin A detection. Probiotic Study Group. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1606-1614
- *Prince AL, Chu DM, Seferovic MD, Antony Microbiome. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5: a023051.
- *Qavasmi A, Landeros-Weisenberger A, Lekman JF, Bloch MH. Meta-analysis of LCPÛFA supplementation of infant formula and visual acuity. *Pediatrics* 2013; 131: e262-e272.
- *Qi Y, Zhang Y, Fein S, Wang C, Loyo-Berrios N. Maternal and breast pump factors associated with breast pump problems and injuries. *J Hum Lact* 2014; 30: 62-72.
- *Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf K, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59-65.
- *Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490: 55–60.
- *Rabot S, Rafter J, Rijkers GT, Watzl B, Antoine JM. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: impact of probiotics on digestive system metabolism. *J Nutr* 2010; 140: 677S-689S.
- *Radke M, Picaud JC, Loui A, Cambonie G, Faas D, Lafeber HN, et al. Starter formula enriched in prebiotics and probiotics ensures normal growth of infants and promotes gut health: a randomized clinical trial. *Pediatr Res* 2017 (en prensa) doi: 10.1038/pr.2016.270.
- *Rahimi R, Nikfar S, Rahimi F, Elahi B, Derakhshani S, Vafaie M, et al. A meta-analysis on the efficacy of probiotics for maintenance of remission and prevention of clinical and endoscopic relapse in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2008; 53:2524–2531.
- *Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 2014; 38: 996-1047.

- *Ramiro-Puig E, Pérez Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. The bowel: A key component of the immune system. *Rev Esp Enferm Dig* 2008; 1:29-34.
- *Rastall R.A. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *J Nutr* 2004; 134: 2022S-2026S.
- *Rather IA, Bajpai VK, Kumar S, Lim J, Paek WK, Park YH. Probiotics and atopic dermatitis: an overview. *Front Microbiol* 2016; 7: 507.
- *Rautava S, Kalliomäki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 119-121
- *Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 2009; 101: 1722-1726.
- *Reglamento Delegado (UE) 2016/127 de la Comisión de 25 de septiembre de 2015. *Diario Oficial de la Unión Europea* 2.2.2016.
- *Rench MA, Baker CJ. Group B streptococcal breast abscess in a mother and mastitis in her infant. *Obstet Gynecol* 1989; 73(5 Pt 2):875-877.
- *Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001; 2: 361-367.
- *Reyes-Reyes RE, Manjarrez-Hernández HA, Drago-Serrano ME. El hierro y la virulencia bacteriana. *Enf Inf Microbiol* 2005; 25: 104-107.
- *Ribas Malagrida S, García Gabarra A. Fórmulas para lactantes sanos: principales novedades de la Directiva 2006/141/CE sobre preparados para lactantes y preparados de continuación. *Acta Pediatr Esp* 2007; 65: 391-403.
- *Rich-Edwards JW, Stampfer MJ, Manson JE, Rosner B, Hu FB, Michels KB, et al. Breastfeeding during infancy and the risk of cardiovascular disease in adulthood. *Epidemiology* 2004; 15:550–556.

- *Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Cultured gut microbiota from twins discordant for obesity modulate adiposity and metabolic phenotypes in mice. *Science* 2014; 341: 1–22.
- *Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006; 47: 241-259
- *Rincón MA, Valenzuela R, Valenzuela A. El ácido estearidónico: un ácido graso omega-3 de origen vegetal con gran potencialidad en salud y nutrición. *Rev Chil Nutr* 2015; 42: 297-300.
- *Rinne M, Kalliomäki K, Salminen S, Isolauri E. Probiotic intervention in the first months of life: short-term effects on gastrointestinal symptoms and long-term effects of gut microbiota. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43: 200-205.
- *Rodrigues D, Li A, Nair D, Blennerhassett M. Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23:e44–e56.
- *Rodríguez JM, Dalmau J. Probióticos para el binomio madre-hijo (I). *Acta Pediatr Esp* 2007a; 65: 452-457.
- *Rodríguez JM, Dalmau J. Probióticos para el binomio madre-hijo (II). *Acta Pediatr Esp* 2007b; 65: 513-518.
- *Rodríguez JM, Jiménez E, Merino V, Maldonado A, Marín ML, Fernández L, et al. Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. *Acta Pediatr Esp* 2008; 66: 77-82.
- *Rodríguez JM The origin of human milk bacteria: Is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation?. *Adv Nutr* 2014; 5:779–784.
- *Rodríguez J M. Probióticos: del laboratorio al consumidor, *Nutr Hosp* 2015; 31(Supl. 1): 33-47.
- *Rodríguez Gómez JM. Microorganismos y salud: bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas. Madrid: Ed. Complutense, 2006.
- *Rodríguez P, Cofré J. Diarrea asociada a *Clostridium difficile* en niños. *Rev Chil Infectol* 2015; 32: 550-558

- *Rodríguez-Palmero M, Koletzco B, Kunz C, Jensen R. Nutricional and biochemical properties of human milk, part II: lipids, micronutrients and bioactive factors. *Clin Perinatol* 1999; 26: 335-359.
- *Roesch LF, Lorca GL, Casella G, Giongo A, Naranjo A, Pionzio AM, et al. Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. *ISME J* 2009; 3: 536–548.
- *Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am* 2009; 23: 73-98.
- *Romeo J, Nova E, Wårnberg J, Gómez-Martínez S, Díaz Ligia LE, Marcos A. Immunomodulatory effect of fibres, probiotics and synbiotics in different life-stages. *Nutr Hosp* 2010; 25: 341-349.
- *Romero R, Kusanovic JP, Espinoza J, Gotsch F, Nhan-Chang CL, Erez O, et al. What is amniotic fluid “sludge”? *Ultrason Obstet Gynecol* 2007; 30: 793-798.
- *Rosenfeldt V, Benfeldt E, Valerius NH, Paerregaard A, Michaelsen KF. Effects of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *J Pediatr* 2004; 145: 612- 616.
- *Rösner H. Developmental expression and possible roles of gangliosides in brain development. *Prog Mol Subcell Biol* 2003; 32:49-73.
- *Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 313-323.
- *Roux ME, McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Weisz-Carrington P, Lamm ME. Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland. *J Exp Med* 1977; 146: 1311-1322.
- *Rubio R, Jofré A, Martín B, Aymerich T, Garriga M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiol* 2014; 38:303-311.
- *Rueda R, Puente R, Hueso P, Maldonado J, Gil A. New data on content and distribution of gangliosides in human milk. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376: 723-727.

- *Rueda R, García-Salmerón JL, Maldonado J, Gil A. Changes during lactation in ganglioside distribution in human milk for mothers delivering preterm and term infants. *Biol Chem* 1996; 377: 599-601.
- *Rueda R, Maldonado J, Narbona E, Gil A. Neonatal dietary gangliosides. *Early Hum Dev* 1998a; 53 Supl: 135-147.
- *Rueda R, Sabatel JL, Maldonado J, Molina-Font JA, Gil A. Addition of gangliosides to an adapted milk formula modifies the levels of fecal *Escherichia coli* in preterm newborn infants. *J Pediatr* 1998b; 133: 90-94.
- *Rueda R. The role of dietary gangliosides on immunity and the prevention of infection. *Br J Nutr* 2007; 98 Supl 1: 68-73.
- *Rueda Cabrera R, Gil Hernández A. Nutrición e inmunidad. En: Gil Hernández A, dir. *Tratado de Nutrición. Tomo I: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. 2ª ed. Madrid: Ed. Médica Panamericana, 2010. pp 895-924.*
- *Rutayisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterology* 2016; 16:86
- *Ruvoen-Clouet N, Mas E, Mariounneau S, Guillon P, Lombardo D, Pendu JL. Bile-salt-stimulated lipase and mucins from milk of 'secretor' mothers inhibit the binding of Norwalk virus capsids to their carbohydrate ligands. *Biochem J* 2006; 393:627-634.
- *Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:261-267
- *Saavedra J, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus Thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994; 344: 1046-1049
- *Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, et al. Demonstration of safety of probiotics a review. *Int J Food Microbiol* 1998; 44: 93-106.

- *Sánchez-Pozo A, Ramírez M, Gil A, Maldonado J, Rosseneu M. Dietary nucleotides enhance plasma lecithin-cholesterol acyl transferase and lipoprotein A-IV in preterm newborn infants. *Pediatr Res* 1995; 37: 328-333.
- *Sánchez-Pozo A, Rueda R, Fontana L, Gil A. Dietary nucleotides and cell growth. *Trends Comp Biochem Physiol* 1998; 5: 99-111.
- *Sánchez-Pozo A, Gil A. Nucleotides as semiesential nutritional components. *Br J Nutr* 2002; 87 Suppl 1: 135-137.
- *Sanders ME, Huis in't Veld J. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999; 76: 293-315.
- *Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 2010; 1: 164-185.
- * Sanz Y, Rastmanesh R, Agostini C. Understanding the role of gut microbes and probiotics in obesity: how far are we?. *Pharmacol Res* 2013; 69: 144-155.
- *Satokari, R., Grönroos, T., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. *Lett. Appl. Microbiol* 2009; 48:8-12.
- *Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans ADL, Saarela M, de Vos WM. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 504-513.
- *Saulnier DM, Ringel Y, Heyman MB, Foster JA, Bercik P, Shulman RJ, et al. The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut Microbes* 2013; 4: 17-27.
- *Savino F, Cordisco L, Tarasco V, Palumeri E, Calabrese R, Oggero R, et al. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in infantile colic: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatrics* 2010; 126: e526-533.
- *Scaldaferri F, Gerardi V, Lopetuso LR, Del Zompo F, Mangiola F, Boškoski I, et al. Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:435268.

- *Schaller JP, Kuchan MJ, Thomas DL, Cordle CT, Winship TR, Buck RH et al. Effect of dietary ribonucleotides on infant immune status (I): Humoral responses. *Pediatr Res* 2004; 56: 883-890.
- *Schaller JP, Buck RH, Rueda R. Ribonucleotides: conditionally essential nutrients shown to enhance immune function and reduce diarrheal disease in infants. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12: 326-328.
- *Schlimme E, Meisel H. Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Die Nahrung* 1995; 39:1-20.
- *Scholtens S, Wijga AH, Smit HA, Brunekreef B, de Jongste JC, Gerritsen J, et al. Long-chain polyunsaturated fatty acids in breast milk and early weight gain in breast-fed infants. *Br J Nutr* 2009; 101: 116-121.
- *Schultz M, Göttl C, Young RJ, Iwen P, Vanderhoof JA. Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38: 293-297.
- *Scott JA, Robertson M, Fitzpatrick J, Knight C, Mulholland S. Occurrence of lactational mastitis and medical management: a prospective cohort study in Glasgow. *Int Breastfeed J.* 2008 ; 3:21.
- *Serrano CA, León M, Harris PR. Desarrollo de la microbiota gastrointestinal en lactantes y su rol en salud y enfermedad. *Ars Médica* 2016; 41: 35-43.
- *Sethi N, Smith D, Kortequee S, Ward Vmm, Clarke S. Benefits of frenulotomy in infants with ankyloglossia. *Int J Pediatr Otorhinolaringol* 2013; 77: 762-765.
- *Shah NP. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci* 2000; 83: 894-907.
- *Shen J, Zuo ZX, Mao AP. Effect of probiotics on inducing remission and maintaining therapy in ulcerative colitis, Crohn's disease, and pouchitis: meta-analysis of randomized controlled trials. *Inflamm Bowel Dis.* 2014; 20: 21-35.
- *Shingal A, Macfarlane G, Macfarlane S, Lanigan J, Kennedy K, Elias-Jones A, et al. Dietary nucleotides and fecal microbiota in formula-fed infants: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1785-1792.

- *Shingal A, Kennedy K, Lanigan J, Clough H, Jenkins W, Elias-Jones A, et al. Dietary nucleotides and early growth in formula-fed infants: a randomized controlled trial. *Pediatrics* 2010; 126: e946-e953.
- *Shiou S-R, Yu Y, Chen S, Ciancio MJ, Petrof EO, Sun J, et al. Erythropoietin protects intestinal epithelial barrier function and lowers the incidence of experimental neonatal necrotizing enterocolitis. *J Biol Chem* 2011; 286:12123–12132.
- *Simmer K, Patole SK, Rao SC. Long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infants born at term. *Cochrane Database Syst Rev* 2011 Dec 7;(12):CD000376.
- *Simon GI, Gorbach SL. Intestinal microflora. *Med Clin North Am* 1982; 66: 557-574.
- *Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1.955-1.958.
- *Simrén M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BM, Spiller RC, Vanner S, et al; Rome Foundation Committee. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 2013; 62: 159-176.
- *Sjögren YM, Tomicic S, Lundberg A, Böttcher MF, Björkstén B, Sverremark-Ekström E, et al. Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 1842-1851.
- *Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11:279–303.
- *Sonnenburg JL, Backhed F (2016) Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 2016; 53: 56-64.
- *Sørensen LP, Guldbrandsen B, Thomasen JR, Lund MS. Pathogen-specific effects of quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in Danish Holstein cattle. *J Dairy Sci* 2008; 91: 2493-2500.
- *Soto A, Martín V, Jiménez E, Mader I, Rodríguez JM, Fernández L. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 59: 78-88.

- *Soubasi V, Kremenopoulos G, Diamanti E, Tsantali C, Sarafidis K, Tsakiris D. Follow-up of very low birth weight infants after erythropoietin treatment to prevent anemia of prematurity. *J Pediatr*.1995; 127:291–297.
- *Shroff KE, Meslin K, Cebra JJ. Comensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun* 1995; 63: 3904-3913.
- *Spiekermann G, Walker WA: Oral tolerance and its role in clinical disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32: 237-255.
- *Stam J, Sauer JJ, Boehm G. Can we define an infant's need from the composition of human milk?. *Am J Clin Nutr* 2013; 98(suppl):521S–528S.
- *Stark PL, Lee A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J Med Microbiol* 1982; 15:189-203.
- *Steel JH, Malatos S, Kennea N, Edwards D, Miles L, Duggan P, et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr Res* 2005; 57: 404-411.
- *Steijns JM, van Hooijdonk AC. Occurrence, structure biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *Br J Nutr* 2000; 84 Suppl 1: 11-17.
- *Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 685-711.
- *Stephen AM, Cummings JH. Mechanism of action of dietary fibre in the human colon. *Nature* 1980; 284: 283-284.
- *Strachan OP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000; 55, Suppl 1: S2-10.
- *Strand TA, Sharma PR, Gjessing HK, Ulak M, Chandyo RK, Adhikari RK, et al. Risk factors for extended duration of acute diarrhea in young children. *PLoS One* 2012; 7(5): e36436.

- *Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, et al. 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.
- *Subbarao P, Anand SS, Becker AB, Befus AD, Brauer M, Brook JR, et al. The Canadian Healthy Infant Longitudinal Development (CHILD) Study: examining developmental origins of allergy and asthma. *Thorax* 2015; 70: 998–1000.
- *Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 1997; 159: 1739-1745.
- *Sun C.M, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, et al . Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007; 204: 1775-1785.
- *Sung V, Collet S, de Gooyer T, Hiscock H, Tang M, Wake M. Probiotics to prevent or treat excessive infant crying. *JAMA Pediatr* 2013; 167: 1150-1157.
- *Sung V, Hiscock H, Tang M, Mensah FK, Nation ML, Satzke C, et al. Treating infant colic with the probiotic *Lactobacillus reuteri*: double blind, placebo controlled randomized trial. *BMJ* 2014; 348:g2107.
- *Szajewska H, Chmielewska A. Growth of infants fed formula supplemented with *Bifidobacterium lactis* Bb12 or *Lactobacillus GG*: a systematic review of randomized controlled trials. *BMC Pediatr* 2013; 13:185.
- *Szajewska H, Guarino A, Hojsak I, Indrio F, Kolacek S, Shamir R, et al; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Use of probiotics for management of acute gastroenteritis: a position paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 58:531-539.
- *Szajewska H, Canani RB, Guarino A, Hojsak I, Indrio F, Kolacek S, et al; ESPGHAN Working Group for ProbioticsPrebiotics. Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016; 62:495-506.

- *Taipale T, Pienihäkkinen K, Isolauri E, Larsen C, Brockmann E, Alanen P, et al. Bifidobacterium animalis subsp lactis BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. *Br J Nutr* 2011; 105: 409-416.
- *Tang ML, Lahtinen SJ, Boyle RJ. Probiotics and prebiotics: clinical effects in allergic disease. *Curr Opin Pediatr* 2010; 22: 626-634.
- *Tannock GW. More than smell: the complexity of the normal microflora. In: Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body. Londres: Chapman & Hall, 1995. pp. 1-35.
- *Tannock GW. Molecular assessment of intestinal microflora. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: S410-S414.
- *Taylor AL, Dunstan JA, Prescott SL. Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 184-191.
- *Taylor SN, Wagner CL, Hollis BW. Vitamin D supplementation during lactation to support infant and mother. *J Am Coll Nutr* 2008; 27:690-701.
- *Thomas C, Versalovic J. Probiotics-host communication. Modulation of signalling pathways in the intestine. *Gut Microbes* 2010; 1: 148-163.
- *Thomas DW, Greer FR, American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition: American Academy of Pediatrics Section on Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics* 2010; 126: 1217-1231.
- *Thompson-Chagoyan OC, Maldonado J, Gil A. Colonization and impact of disease and other factor on intestinal microbiota. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2069-2077.
- *Thomsen AC, Espersen T, Maigaard S. Course and treatment of milk stasis, noninfectious inflammation of the breast, and infectious mastitis in nursing women. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 149: 492-495.
- *Thurl S, Munzert M, Henker J, Boehm G, Muller-Werner B, Jelinek J, et al. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *Br J Nutr* 2010; 104:1261–1271.

- *Tillisch K, Labus J, Kilpatrick L, Jiang Z, Stains J, Ebrat B, et al. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology* 2013; 144: 1394-1401.
- *Tillisch K. The effects of gut microbiota on CNS function in humans. *Gut Microbes* 2014; 5: 404–410.
- *Thompson-Chagoyan OC, Fallani M, Maldonado J, Vieites JM, Khanna S, Edwards C, Gil A. Faecal microbiota and short-chain fatty acid levels in faeces from infants with cow's milk protein allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 156:325-332.
- *Thompson-Chagoyan OC, Vieites JM, Maldonado J, Edwards C, Gil A. Changes in faecal microbiota of infants with cow milk protein allergy - a Spanish prospective case-control six-month follow-up study. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21: e394-e400
- *Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012; 489: 242-249.
- *Turck D, Bernet JP, Marx J, Kempf H, Giard P, Walbaum O, et al. Incidence and risk factors of oral antibiotic-associated diarrhea in an outpatient pediatric population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37:22–26.
- *Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature* 2007; 449: 804–810.
- *Tursi A, Brandimarte G, Papa A, Giglio A, Elisei W, Giorgetti GM, et al. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol*. 2010; 105: 2218–2227.
- *Uauy R, Stringel G, Thomas R, Quan R. Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990; 10:497-503.
- *Uauy R, Dangour AD. Fat and fatty acid requirements and recommendation for infants of 0-2 years and children of 2-18 years. *Ann Nutr Metab* 2009; 55: 76-96.

- *Uhlig, HH, Powrie F. Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. *J Clin Invest* 2003; 112: 648-651.
- *Urbanska M, Szajewska H. The efficacy of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in infants and children: a review of the current evidence. *Eur J Pediatr* 2014; 173: 1327-1337.
- *Urbańska M, Gieruszczak-Białek D, Szajewska H. Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for diarrhoeal diseases in children. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016; 43: 1025-1034.
- *Urdampilleta Otegui A, Martínez Sanz JM, González-Muniesa P. Intervención dietético-nutricional en la prevención de la deficiencia de hierro. *Nutr Clín Diet Hosp* 2010; 30: 27-41.
- *Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, Rinders BJ, Van Eldore J. Reliability of the *ica*, *aap*, and *at/E* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolated in the diagnosis of catheterrelated infectious. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 114-119.
- *Vandenplas Y, Huys G, Daube G. Probiotics: an update. *J Pediatr (Rio J)*. 2015; 91: 6–21.
- *Varghese AK, Verdu EF, Bercik P, Khan WI, Blennerhassett PA, Szechtman H, et al. Antidepressants attenuate increased susceptibility to colitis in a murine model of depression. *Gastroenterology* 2006; 130: 1743–1753.
- *Vázquez E, Gil A, García-Olivares E, Rueda R. Dietary gangliosides increase the number of intestinal IgA-secreting cells in weanling mice. *Immunol Letters* 1999; 69: 44-47.
- *Vázquez E, Gil A, Rueda R. Dietary gangliosides increase the number of intestinal IgA-secreting cells and the luminal content of secretory IgA in weanling mice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31 Supl 2: 133.
- *Vázquez E, Gil A, Rueda R. Dietary gangliosides positively modulate the percentages of Th1 and Th2 lymphocyte subsets in small intestine of mice at weaning. *Biofactors* 2001; 15: 1-9.
- *Velaphi SC, Cooper PA, Bolton KO, Mokhachane M, Mphahlele RM, Beckh-Arnold E, et al. Growth and metabolism of infants born to women infected with human immunodeficiency virus and fed acidified whey-adapted starter formulas. *Nutrition* 2008; 24: 203-211.

- *Vendt N, Grünberg H, Tuure T, Malminiemi O, Wuolijoki E, Tillmann V, et al. Growth during the first 6 months of life in infants using formula enriched with *Lactobacillus rhamnosus* GG: double-blind, randomized trial. *J Hum Nutr Diet* 2006; 19: 51-58.
- *Verbeek R, Bsibsi M, Plomp A, van Neerven RJJ, Biesebeke T, van Noort JM. Lather rather than early responses of human dendritic cells highlight selective induction of cytokines, chemokines and growth factors by probiotic bacteria. *Benef Microbes* 2010; 1: 109-119.
- *Vesterlund S, Vankerckhoven V, Saxelin M, Goossens H, Salminen S, Ouwehand AC. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *Int J Food Microbiol* 2007; 116: 325-331.
- *Victora CG, Smiyh PG, Vaughan JP, Nobre LC, Lombardi C, Teixeira AM, et al. Evidence for protection by breast-feeding against infant deaths from infectious diseases in Brazil. *Lancet* 1987; 330: 319-322.
- *Victora CG, Behague DP, Barros FC, Olinto MT, Weiderpass E. Pacifier use and short breastfeeding duration: cause, consequence, or coincidence?. *Pediatrics* 1997; 99:445-453.
- *Vidal AC, Murphy SK, Murtha AP, Schildkraut JM, Soubry A, Huang Z, et al. Associations between antibiotic exposure during pregnancy, birth weight and aberrant methylation at imprinted genes among offspring. *Int J Obes (Lond)* 2013; 37: 907–913.
- *Vliagoftis H, Kouranos VD, Betsi GI, Falagas ME. Probiotics for the treatment of allergic rhinitis and asthma: systematic review of randomized controlled trials. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 101: 570-579.
- *Vogel A, Hutchison BL, Mitchell EA. Mastitis in the first year postpartum. *Birth* 1999; 26: 218-225.
- *Vogel HJ. Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochem Cell Biol* 2012; 90: 233–244.
- *Wallace TC, Guarner F, Madsen K, Cobano MD, Gibson G, Hentges E, et al. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr Rev* 2011; 69: 392-403.
- *Walker WA. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Ann Nutr Metab* 2013; 63 Suppl 2: 8-15

- *Wang B, McVeagh P, Petoez P, Brand-Miller J. Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breast fed compared with formula fed infants. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 1024-1029.
- *Wang B. Molecular mechanism underlying sialic acid as an essential nutrient for brain development and cognition. *Adv Nutr* 2012; 3: 465S-472S.
- *Wang H-X, Wang Y-P. Gut microbiota-brain axis. *Chin Med J (Engl)* 2016; 129: 2373–2380.
- *Wang Y, Li X, Ge T, Xiao Y, Liao Y, Cui Y, et al. Probiotics for prevention and treatment of respiratory tract infections in children: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95: e4509.
- *Wang ZH, Gao QY, Fang JY. Meta-analysis of the efficacy and safety of Lactobacillus-containing and Bifidobacterium-containing probiotic compound preparation in Helicobacter pylori eradication therapy. *J Clin Gastroenterol.* 2013; 47: 25-32.
- *Ward TL, Hosid S, Ioshikhes I, Altosaar I. Human milk metagenome: a functional capacity analysis. *BMC Microbiol* 2013; 13:116.
- *Warner BB, Tarr PI. Necrotizing enterocolitis and preterm infant gut bacteria. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2016; 21: 394-399.
- *Watkins JB. Mechanisms of fat absorption and the development of gastrointestinal function. *Pediatr Clin North Am* 1975; 22:721-730.
- *Webb AN, Hao W, Hong P. The effect of tongue-tie division on breastfeeding and speech articulation: a systematic review. *Inn J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013; 77: 635-646.
- *Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. Effects of a probiotic infant formula on infections in child care centers; comparison of two probiotic agents. *Pediatrics* 2005; 115: 5-9.
- *Weizman Z, Alsheikh A. Safety and tolerance of a probiotic formula in early infancy comparing two probiotic agents: a pilot study. *J Am.Coll Nutr* 2006; 25: 415-419.
- *Wells JE, Hylemon PB. Identification and characterization of a bile acid 7αdehydroxylating strain isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 1107-1113.

- *Weng M, Walker WA: The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *J Dev Orig Health Dis* 2013; 4: 203-214.
- *Whelan K. Probiotics and prebiotics in the management of irritable bowel syndrome: a review of recent clinical trials and systematic reviews. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011; 14: 581-587.
- *Wickens K, Stanley TV, Mitchell EA, Barthow C, Fitzharris P, Purdie G, et al. Early supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* HN001 reduces eczema prevalence to 6 years: does it also reduce atopic sensitization?. *Clin Exp Allergy* 2013; 43: 1048-1057.
- *Willumsen JF, Filteau SM, Coutsooudis A, Uebel KE, Newell ML, Tomkins AM. Subclinical mastitis as a risk factor for mother-infant HIV transmission. *Adv Exp Med Biol*. 2000; 478:211-223.
- *Wilson KH, Blitchington RB. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 2273-2278.
- *Wolvers D, Antoine JM, Myllyluoma E, Schrezenmeir J, Szajewska H, Rijkers GT. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of infections by probiotics. *J Nutr* 2010; 140: 6985-7125.
- *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 WW, Hachey DL, Insull W, Opekun AR, Klein PD. Effect of dietary cholesterol on cholesterol synthesis in breast-fed and formula-fed infants. *J Lipid Res* 1993; 34:1403–1411.
- *Woo JG, Guerrero ML, Guo F, Martin LJ, Davidson BS, Ortega H, et al. Human milk adiponectin affects infant weight trajectory during the second year of life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54:532–539.
- *World Health Organization. Mastitis: causes and management. Publication number WHO/FCH/CAH/00.13. World Health Organization, Geneva, 2000.
- * World Health Organization. Multicenter Growth Reference Study Group (MGRS). WHO Child Growth Standards. World Health Organization, Genova, 2006. (<http://www.who.int/childgrowth/mgrs/es/>)
- *Xanthou M. Immune protection of human milk. *Biol Neonate* 1998; 74: 121-133.

- *Xu L, Wang Y, Wang Y, Fu J, Sun M, Mao Z, Vandenplas Y. A double-blinded randomized trial on growth and feeding tolerance with *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 in formula-fed preterm infants. *J Pediatr (Rio J)*. 2016; 92: 296-301.
- *Xu M, Wang J, Wang N, Sun F, Wang L, Liu X-H. The efficacy and safety of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for infantile colic: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* 2015; 12:CD004796.
- *Yao Y, Sturdevant DE, Otto M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol soluble modulins in formation of biofilms. *J Infect Dis* 2005; 191: 289-298.
- *Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012; 486: 222-227.
- *Yu VYH. Scientific rationale and benefits on nucleotide supplementation on infant formula. *J Pediatr Child Health* 2002; 38: 543-549.
- *Zajac AE, Adams AS, Turner JH. A systematic review and meta-analysis of probiotics for the treatment of allergic rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2015; 5: 524-532.
- *Zhang GQ, Hu HJ, Liu CY, Zhang Q, Shakya S, Li ZY. Probiotics for prevention of atopy and food hypersensitivity in early childhood: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95: e2562.
- *Zheng X, Lyu L, Mei Z. *Lactobacillus*-containing probiotic supplementation increases *Helicobacter pylori* eradication rate: evidence from a meta-analysis. *Rev Esp Enferm Dig*. 2013; 105: 445-453.
- *Zhou P, Li Y, Ma LY, Lin HC. The Role of Immunonutrients in the Prevention of Necrotizing Enterocolitis in Preterm Very Low Birth Weight Infants. *Nutrients* 2015; 7: 7256-7270.
- *Ziegler EE, Fomon SJ. Potential renal solute load of infant formulas. *J Nutr* 1989; 119: 1785-1788
- *Zocco MA, dal Verme LZ, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, et al. Efficacy of *Lactobacillus GG* in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1567-1574.

*ZukieWicz-Sobczak W, Wróblewska P, Adamczuk P, Silny W. Probiotic lactic acid bacteria and their potential in the prevention and treatment of allergic diseases. *Centr Eur J Immunol* 2014; 39: 104-108.

9.-ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES

PUBLICACIÓN DE CALIDAD (INDICIOS DE CALIDAD)

Maldonado-Lobón JA, Gil-Campos M, Maldonado J, López-Huertas E, Flores-Rojas K, Valero AD, Rodríguez-Benítez MV, Bañuelos O, Lara-Villoslada F, Fonollá J, Olivares M. Long-term safety of early consumption of *Lactobacillus fermentum* CECT5716: A 3-year follow-up of a randomized controlled trial. **Pharmacol Res.** 2015 May-Jun; 95-96:12-9. doi: 10.1016/j.phrs.2015.01.006

Impact factor: 4,816 Q1

Maldonado-Lobón JA, Díaz-López MA, Carputo R, Duarte P, Díaz-Ropero MP, Valero AD, Sañudo A, Sempere L, Ruiz-López MD, Bañuelos Ó, Fonollá J, Olivares Martín M. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 Reduces *Staphylococcus* Load in the Breastmilk of Lactating Mothers Suffering Breast Pain: A Randomized Controlled Trial. **Breastfeed Med.** 2015 Nov; 10(9):425-32. doi: 10.1089/bfm.2015.0070.

Impact factor: 1,438 Q3

OTRAS CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS RELACIONADAS CON LA TESIS

ARTÍCULOS

Gil-Campos M, López MÁ, Rodríguez-Benítez MV, Romero J, Roncero I, Linares MD, Maldonado J, López-Huertas E, Berwind R, Ritzenthaler KL, Navas V, Sierra C, Sempere L, Geerlings A, Maldonado-Lobón JA, Valero AD, Lara-Villoslada F, Olivares M. Lactobacillus fermentum CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1-6 months of age: a randomized controlled trial. **Pharmacol Res.** 2012 Feb; 65(2):231-8. doi: 10.1016/j.phrs.2011.11.016

Impact factor: 4,346 Q1

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Olivares M, Gil M, López M, Rodríguez M, Romero J, Roncero I, Linares M, Maldonado J, López-Huertas E, Berwind R, Rirtzenthaler K, Sempere L, Geerlings A, Maldonado-Lobón J, Valero A, Lara-Villoslada F. Safety trial of an infant formula enriched with the human milk probiotic strain L. Fermentum CECT 5716.

11th European Nutrition Conference (FENS) Madrid, Spain, October 26-29, 2011.

Olivares M, Gil M, López MA, Rodríguez V, Romero J, Roncero I, Linares M, **Maldonado J**, López-Huertas E, Berwind R, Rirtzenthaler K, Sempere L, Geerlings A, Maldonado-Lobón J, Valero AD, Geerlings A, Lara-Villoslada F. Infant formula enriched with the human milk probiotic strain L. Fermentum CECT 5716 prevents gastrointestinal infections in infants.

ESPGHAN Update 2012. Stockolm (Sweden), April 27-28, 2012.

Maldonado-Lobón JA, Gil-Campos M, Maldonado J, Flores-Rojas K, Rodríguez-Benítez MV, Valero AD, Lara-Villoslada F, Olivares M, Fonollá J. Seguridad a largo plazo del consumo durante los primeros meses de vida de Lactobacillus fermentum CECT5716 incluido en una fórmula infantil. Evaluación a los 3 años de edad.

V Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud. Evidencia científica. Valencia, 23-24 Enero 2014.

Maldonado-Lobón JA, Díaz MA, Bañuelos O, Valero AD, Díaz-Ropero MP, Fonollá J, Olivares M.

Lactobacillus fermentum CECT 5716 reduce la carga de Staphylococcus en la leche de mujeres que sufren de dolor en el pecho durante la lactancia mejorando la sintomatología

V Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud. Evidencia científica. Valencia 23 - 24 enero, 2014.

José Antonio Maldonado-Lobón, Antonio David Valero, Óscar Bañuelos, María-Paz Díaz-Ropero, Juristo Fonollá, Mónica Olivares. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 reduce load of staphylococcus sp. in breastmilk and pain in women suffering breast pain during lactation.

9th International Breastfeeding and Lactation Symposium. April 4-5, 2014, Madrid, Spain.

Mercedes Gil-Campos, José Antonio Maldonado-Lobón, José Maldonado, Katherine Flores-Rojas, Federico Lara-Villoslada, Juristo Fonollá. Seguridad a largo plazo del consumo durante los primeros meses de vida de *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 incluido en una fórmula infantil. Evaluación a los 3 años de edad.

Congreso Extraordinario de la Asociación Española de Pediatría. Madrid 5 - 7Junio, 2014.

Maldonado-Lobón JA, Flores-Rojas K, Gil-Campos M, Maldonado J, Valero AD, Lara-Villoslada F, Olivares M, Fonollá J. Estudio de los efectos a largo plazo del consumo de una fórmula infantil suplementada con *Lactobacillus fermentum* CECT5716.

XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas. Granada 24 – 26 Septiembre, 2014.

