

Mesa Redonda: Avances en patología nutricional

Alimentos funcionales. Su papel en la nutrición preventiva y curativa

R. TOJO SIERRA, R. LEIS TRABAZO

Unidad de Investigación en Nutrición y Desarrollo Humano de Galicia. Departamento de Pediatría. Hospital Clínico Universitario de Santiago. Universidad de Santiago de Compostela.

Mientras que en el siglo XX, la meta de la nutrición humana era asegurar un aporte adecuado de energía, macro y micronutrientes, a partir del siglo XXI además de esto, adquiere importancia la presencia de componentes funcionales en la dieta. El aporte de alimentos funcionales o con componentes funcionales o bioactivos, tanto naturales, como procesados, en la edad pediátrica es una de las estrategias más prometedoras en el campo de la nutrición infantil. Existe evidencia cada vez más creciente de que estos alimentos tienen efectos beneficiosos en funciones específicas del organismo, que van más allá de los nutricionales habituales, con efectos positivos sobre el estado de bienestar y la salud o la reducción del riesgo de enfermedad.

El conocimiento cada vez mayor de la implicación de los alimentos funcionales en la regulación de la expresión génica, de la proliferación y función celular, de la inmunomodulación, de la ecología intestinal, del sistema de antioxidación o del metabolismo es una muestra de la trascendencia que éstos tendrán en el futuro en los hábitos alimentarios de la población, tanto infantil, como adulta o anciana⁽¹⁻⁵⁾. Todo ello sumado al conocimiento del genoma y la biotecnología permitirán en un corto espacio de tiempo la realización de dietas de diseño e individualizadas, *dietas optimizadas*.

PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS

Dentro de los alimentos funcionales han adquirido un papel relevante los probióticos, prebióticos y simbióticos, con importantes funciones en la prevención y tratamiento de las enfermedades, en la regulación del metabolismo y en

la calidad de vida de los niños y adolescentes. Los probióticos son microorganismos vivos, no patógenos, agentes biológicos con un impacto significativo en la composición de la microflora intestinal, tanto cualitativa, como cuantitativamente. Actúan estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de un número limitado de bacterias, en especial, las bifidobacterias y *Lactobacillus* (bacterias amigas, beneficiosas o buenas), e inhibiendo el crecimiento de la flora patógena. Este hecho es muy importante desde el punto de vista fisiológico, ya que la microflora intestinal tiene a lo largo de todo el ciclo vital una gran influencia en el mantenimiento de la homeostasis, de la función intestinal, de la inmunomodulación, como barrera a la colonización por patógenos intestinales y diseminación bacteriana intestinal, en la alergia, en la absorción de la lactosa, en el metabolismo, en la producción de vitaminas y factores de crecimiento, en la síntesis de antimicrobianos y en la neutralización de toxinas, mutágenos y tumorigenos y como fuentes de energía⁽⁶⁻¹⁶⁾. (Tabla I)

Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles, fundamentalmente hidratos de carbono, y en menor medida proteínas, cuya fermentación bacteriana en el colon favorece el crecimiento selectivo y/o actividad de un número limitado de bacterias, principalmente bifidobacterias y lactobacilos en detrimento del crecimiento de patógenos en la flora colónica, además juegan un importante papel en funciones inmunes gastrointestinales, en la biodisponibilidad de minerales, en el metabolismo de lípidos y en la carcinogénesis colónica. Así, existen fuertes evidencias de que la inulina y la oligofruktosa tienen un efecto prebiótico, estimulando selectivamente el creci-

TABLA I. ALIMENTOS FUNCIONALES. EJEMPLOS DE PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS⁽¹⁶⁾

Alimentos colónicos	Definición	Ejemplo componente	Alimento usual
Probióticos	Alimento suplementado con bacterias vivas que alcanzan el colon y favorecen el balance de la microflora intestinal, la salud y el bienestar	Lactobacilos Bifidobacterias	Yogur y otros productos lácteos fermentados
Prebióticos	Alimentos o suplementos no digestibles y fermentables en el colon, que favorecen el crecimiento selectivo de bacterias no patógenas con beneficios para la salud y bienestar	Inulina Oligosacáridos Galactooligosacáridos Fructooligosacáridos	Alimentos naturales o incorporados a bebidas, productos lácteos, pastelería
Simbióticos	Mezcla de pro y prebióticos, que favorece la supervivencia e implantación de microorganismos vivos con beneficios para la flora intestinal y la salud y bienestar	Fructooligosacáridos + bifidobacterias	Productos lácteos fermentados

miento de bifidobacterias en la flora colónica, mejorando el hábito intestinal, tanto en frecuencia, como en cantidad de heces y favoreciendo la biodisponibilidad del calcio^(3,15,17). La mayoría de las bifidobacterias están adaptadas a la utilización de prebióticos, pero otras especies de bacterias son capaces también de metabolizarlos. Los componentes alimentarios que parecen ejercer el mejor efecto prebiótico son los fructooligosacáridos (FOS), como la chicoria y la inulina, y en menor medida la lactulosa y el lactitol. El número de bifidobacterias fecales se ve incrementado por la ingesta de FOS, de forma dosisdependiente, convirtiéndose, por tanto, en una alternativa potencial a la administración directa de probióticos. Los prebióticos se ingieren a través de alimentos naturales o incorporándolos a alimentos, como productos lácteos, bebidas, pastelería, cereales, etc.⁽¹⁶⁻²¹⁾. (Tabla II)

Otro uso posible de los prebióticos es en combinación con bacterias probióticas. Esta combinación es conocida como simbiótico y puede ofrecer ventajas al mejorar la supervivencia e implantación de los probióticos en el tracto intestinal, ya que su sustrato específico está disponible desde el momento de la ingestión. Algunos posibles simbióticos son la combinación de bifidobacterias con FOS y lactobacilos con lactitol.⁽²¹⁻²³⁾

TABLA II. EFECTO BIFIDOGÉNICO DE LOS CARBOHIDRATOS DIETÉTICOS (PREBIÓTICOS)⁽¹⁶⁾

Tipo	Incremento bifidobacterias (log 10)
Palatinosa	3,3
Oligosoja	2,7
Glucosa	1,8
Polidextrosa	1,7
Oligofruktosa	1,6
Sacarosa	1,5
Oligomaltosa	1,4
Oligoxilosa	1,4
Oligogalactosa	0,9
Lactulosa	0,8
Almidón	0,7
Oligoglucosa	0,5
Fructosa	0,4

Probióticos, prebióticos y simbióticos en la alimentación del recién nacido y del lactante.

Las propiedades de los pre y probióticos se ponen de manifiesto desde los primeros meses de vida, ya que la composición de la microflora intestinal está muy influida por el tipo de alimentación. En el momento del nacimiento el tracto gastrointestinal es estéril, pero a las pocas horas, las bac-

TABLA III. COMPONENTES IMPORTANTES DE LA LECHE DE MUJER QUE JUEGAN UN PAPEL EN LA INMUNIDAD SISTÉMICA Y MUCOSA⁽²⁵⁾

- Citocinas antiinflamatorias	- Lisozima
- Agentes antioxidantes	- Nucleótidos
- Péptidos de caseína	- Poliaminas
- Factor de crecimiento epitelial	- Antagonistas de la proteasa
- Gangliósidos	- Anticuerpos específicos
- Lactoferrina	- Ig A secretora
- Lactoperoxidasa	

terias ingeridas durante el parto colonizan con rapidez el intestino neonatal y pronto alcanzarán un número que es 10 veces superior al de las células del organismo. Tras la colonización inicial, la flora intestinal se mantiene bastante constante durante la vida, siendo difícil cambiarla de forma permanente, pues el sistema inmunológico intestinal aprende a reconocer y tolerar las especies bacterianas presentes ya en las primeras etapas de la infancia.

En los lactantes alimentados con leche de mujer, en parte debido a la presencia de prebióticos oligosacáridos en la misma, se desarrolla fundamentalmente una flora de grampositivos, lactobacilos, bifidobacterias, enterococos, destacando como gramnegativos los *E. coli*, mientras que en los alimentados con leche de fórmula (de inicio o continuación) sin suplementar con probióticos ni prebióticos, la flora es más compleja, predominando los *E. coli*, bacteroides y otros anaerobios y menos bifidobacterias, como se demuestra al usar métodos de identificación y detección molecular (FISH)⁽²⁴⁾. En los alimentados con leche de mujer, dado los componentes específicos que ésta aporta (lactoferrina, lisozima, fibronectina, mucina, oligosacáridos, nucleótidos, N-acetilglucosamina, glucosa, galactosa, fructosa, lípidos, Ig A secretora y otros factores bifidogénicos), junto a una menor cantidad de proteínas, se favorece el crecimiento selectivo de bifidobacterias y el ambiente intestinal tiene más capacidad inmunomoduladora y antimicrobiana que en los alimentados con leche de fórmula⁽²⁵⁾ (Tabla III). Estas diferencias favorecen la no proliferación de patógenos y, por tanto, la menor incidencia de infecciones gastrointestinales, urinarias y/o respiratorias en los alimentados con leche de mujer⁽²⁵⁻²⁸⁾ (Tabla IV). En niños pretérmino alimentados con leche de fórmula con oligosacáridos (90% galactooligosacáridos (GOS) y 10% fructooligosacáridos (FOS)) a una concentración de 1g/dL se

TABLA IV. CONTENIDO EN PREBIÓTICOS (OLIGOSACÁRIDOS) DE LA LECHE DE MUJER⁽²⁸⁾

Tipo de oligosacáridos	Período de lactancia (días)				
	4	10	30	60	90
<i>Oligosacáridos primarios</i>	3,1	2,7	2,2	2,7	3,1
<i>Fucosil-oligosacáridos</i>	13,8	12,6	11,5	12,1	11,4
<i>Sialil-oligosacáridos</i>	3,3	2,7	2,1	1,7	1,5

demuestra una estimulación del crecimiento de bifidobacterias intestinales y una reducción, tanto del número absoluto, como de la proporción de patógenos con importancia clínica en la flora fecal⁽²⁹⁾. Así mismo, la suplementación de una leche de prematuros con GOS y FOS a una concentración de 10g/L estimula el crecimiento de bifidobacterias en el intestino y produce unas heces con similares características a las del pretérmino alimentado con leche de mujer⁽³⁰⁾. Al comparar recién nacidos a término alimentados con una fórmula estándar y otros con fórmula con GOS/FOS se observa un incremento de las bifidobacterias y una reducción de los niveles de *Clostridium*, *E. coli* y eubacterias, microorganismos potencialmente patógenos⁽³¹⁾. La administración en los primeros meses de vida de leche de fórmula enriquecida con galacto y fructooligosacáridos es bien tolerada, mantiene un crecimiento y una masa mineral adecuada e incrementa significativamente y rápidamente el porcentaje de bifidobacterias endógenas y la habilidad para mantener estable la flora intestinal^(32,33). Además, un estudio reciente demuestra que la suplementación de la leche de fórmula con GOS y FOS tiene un efecto estimulante dosis dependiente en el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos en el intestino, y da lugar a heces más blandas a medida que se incrementa la dosis de suplementación⁽³⁴⁾. La ingesta de leche de fórmula adicionada de bifidobacterias produce ya al mes de vida una prevalencia de su colonización, casi similar a la de los alimentados con leche de mujer y significativamente mayor a la de los alimentados con fórmula sin microorganismos. Estas leches de fórmula adicionadas con probióticos (*bifidobacteria latis*, *B.L. S. thermophilus*) consumidas de forma prolongada son bien toleradas, mantienen un crecimiento normal en niños de 1-3 años, recuperan el crecimiento de malnutridos, mejo-

ran la motilidad intestinal y el ritmo y tipo de heces y disminuyen el riesgo de infección y de eritema del pañal⁽³⁵⁻³⁷⁾. El uso de leches de continuación, preparados lácteos de crecimiento y otros alimentos infantiles, como papillas enriquecidos con probióticos y/o prebióticos promueven un incremento del número y la actividad de lacto y bifidobacterias, una mejor función intestinal y un crecimiento adecuado, como pone de manifiesto el hecho de que el suplemento de una papilla con 2-4 g/día de FOS en lactantes a partir del 4º mes y seguidos durante 8 semanas, producen un aumento altamente significativo de unidades formadoras de colonias (UFC) de bifidobacterias por gramo de heces significativamente superior al grupo control ($29,8 \times 10^9$ vs $7,3 \times 10^9$, $p < 0,01$) y de *Lactobacillus* ($2,8 \times 10^9$ vs $1,3 \times 10^7$, $p < 0,05$). En un reciente estudio se demuestra que lactantes de 4 meses que reciben prebióticos tienen significativamente más bifidobacterias fecales que los controles (57 vs 32%, $p < 0,005$), por tanto, la introducción de galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS) en alimentos sólidos favorecerá el crecimiento de bifidobacterias en la microflora intestinal^(9,38-40).

La leche de mujer continúa siendo el alimento ideal, pero las leches de fórmula acercándose cada vez más a ella, pueden convertirse en un posible sustituto⁽⁴¹⁾.

Efectos de los probióticos, prebióticos y simbióticos en la patología gastrointestinal

Existen claras evidencias de los efectos nutricionales, preventivos y terapéuticos de los probióticos (*Lactobacillus casei rhamnosus* (LGG), *L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. johnsonii*, *B. bifidum*, *Strep. thermophilus* y *Saccharomyces boulardii*) sobre la patología del tracto gastrointestinal, en la diarrea aguda vírica o bacteriana, post-antibióticos y quimioterápicos, del viajero, en la intolerancia a la lactosa, en la alergia a alimentos, en la colitis, en el síndrome del colon irritable, en la enfermedad inflamatoria intestinal, en la inhibición de la colonización gástrica y actividad del *helicobacter pylori*, en el estreñimiento y en el cáncer^(7,42).

Diarrea aguda

El tracto gastrointestinal no es sólo importante en la homeostasis por su papel principal en la digestión y absorción, sino también por su función inmunomoduladora. El intestino es un importantísimo órgano linfático y la muco-

sa intestinal es una barrera protectora contra la colonización de patógenos y contra antígenos, ya sean microorganismos o alimentos. El control de las infecciones mediante estrategias diferentes a la antibioterapia, que lleva implícito el riesgo de desarrollo de resistencias y disminución de la flora no patógena, se convierte en una prioridad. El uso de probióticos representa una alternativa biometabólica prometedoras en la prevención y tratamiento de la diarrea⁽⁴³⁾.

En cuanto a los mecanismos potenciales del efecto de los probióticos en la enfermedad diarreica se debe tener presente^(7,14,44-56):

1. La producción de sustancias antibacterianas (bacteriocinas, lactacinas, lactocinas, helveticinas, bifidinas, etc.). La inhibición de la adhesión de patógenos y la competición por receptores en la mucosa intestinal.
2. La producción de ácidos grasos de cadena corta, que acidifican el lumen intestinal, inhibiendo a bacterias, como las coliformes, y manteniendo el trofismo de la mucosa.
3. La disminución de la permeabilidad intestinal.
4. La acción competitiva de estos agentes por nutrientes lumbinales.
5. La inmunomodulación: el aumento de la Ig A secretora, la regulación de citocinas intestinales y de la respuesta inmunitaria contra patógenos.

Se ha demostrado la inhibición de la adherencia de patógenos y actividad bacteriana utilizando un cultivo de la línea celular Caco-2 en un modelo *in vitro*, tras la administración de *Lactobacillus casei rhamnosus* (Lcr35)⁽⁴³⁾. Junto al aporte de probióticos, la administración de prebióticos favorece la multiplicación de las bifidobacterias y los lactobacilos, que compiten con los receptores de los patógenos en la mucosa intestinal, favoreciendo, por tanto, una acción antiinfecciosa⁽⁵⁷⁾.

El *Lactobacillus casei rhamnosus* (Lcr35) es un buen ejemplo de la eficacia de los probióticos contra la colonización y crecimiento de patógenos en el tracto gastrointestinal, ya que inhibe la adherencia del *Escherichia coli enteropatógeno* (EPEC), *Escherichia coli enterotoxigénico* (ETEC) y la *Klebsiella pneumoniae* a la mucosa intestinal, y presenta una actividad antibacteriana con inhibición del crecimiento de la *Klebsiella pneumoniae*, de la *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Clostridium difficile*⁽⁴³⁾. Se ha demostrado una distinta adhesión de las diferentes cepas comerciales de probióticos a la mucosa intestinal desplazando a los patógenos⁽⁵⁸⁾.

El uso de probióticos en la prevención de la diarrea en la infancia se inicia al comienzo de la década de los 90 en un estudio en niños de 5-24 meses de edad, con prolongada hospitalización por patología extraintestinal. Los niños fueron aleatorizados, recibiendo unos una fórmula infantil estándar y otros una suplementada con *Bifidobacterium* y *S. thermophilus* durante 17 meses. Sólo un 7% de los que recibieron probióticos desarrolló diarrea *vs* un 31% del control⁽⁵⁹⁾. En un estudio en niños de 6-24 meses de edad malnutridos, pertenecientes a una población indígena peruana, que reciben LGG o placebo 6 días/semana durante 15 meses, los que reciben probiótico presentan significativamente menos episodios de diarrea/niño/año, la diarrea era menos presente en los mayores de 18 meses, en especial en los no alimentados con leche de mujer⁽⁶⁰⁾.

En un estudio aleatorizado doble ciego placebo-control en niños de 1-36 meses de edad hospitalizados por razones extraintestinales, se le administra a un grupo 6×10^9 UFC/día de LGG y a otro placebo. El grupo control desarrolla diarrea por rotavirus más frecuentemente que el que recibió probióticos, 6 episodios *vs* un episodio (16,7 *vs* 2,2%), así como para todos los tipos de episodios de diarrea, 12 por sólo 3 (33,3 *vs* 6,6%), $p < 0,002$. Niños menores de 2 años que asisten a guarderías alimentados con leche enriquecida con probióticos, presentan menos episodios infecciosos y menos días de ausencia por enfermedad que los controles. Todos estos estudios ponen de manifiesto el valor de los probióticos como preventivos de infección, especialmente de diarrea por rotavirus^(61,62).

Isolauri pone de manifiesto en 1991 el efecto beneficioso de los probióticos en la diarrea aguda. A niños bien nutridos de 4-45 meses de edad, ingresados en el hospital por diarrea, se les administra a un grupo leche fermentada enriquecida en L49 y a otros placebo. En los que recibieron probiótico se reduce significativamente la duración de la diarrea, $p < 0,001$ (82% la infección es por rotavirus). Cuando se analiza sólo el grupo de infección por rotavirus, el descenso de la duración de diarrea es más significativa. En la convalecencia el 90% del grupo que recibió LGG desarrolló anticuerpos Ig A específicos a rotavirus, por sólo 45% del grupo control⁽⁶³⁾. En un estudio aleatorizado y controlado, pero no ciego, el grupo de niños con deshidratación media o moderada, que recibe LGG a dosis de 3×10^7 UFC muestra una duración significativamente menor de la diarrea que el

control. El 61% tiene rotavirus y la persistencia en heces es también significativamente menor en el grupo que recibe probióticos, $p < 0,002$ ⁽⁶⁴⁾.

En un reciente estudio multicéntrico doble ciego, placebo-control que comprende a niños de 1 mes a 3 años de 11 países europeos, Egipto e Israel ingresados en el hospital por diarrea aguda y donde la diarrea es causada en el 35% de los casos por rotavirus, 32,6% por bacterias o protozoos y 32,4% por etiología no determinada, se les administra LGG a dosis de 10^{10} UFC/250mL de solución de rehidratación oral (SRO "ad libitum") a un grupo y al otro, placebo. La duración de la diarrea es de $71,9 \pm 35,8$ horas en los del placebo y de $58,3 \pm 27,6$ en el grupo LGG, $p < 0,003$. Los más beneficiados son los afectados por rotavirus, donde la duración es de $56,2 \pm 16,9$ contra $76,6 \pm 41,6$ horas del control, $p < 0,008$. Además, la diarrea dura más de 6 días sólo en el 2,7% del grupo LGG y en el 10,7% de los controles, $p < 0,001$. En los niños con etiología bacteriana demostrada, las diferencias entre los dos grupos no son significativas⁽⁶⁵⁾.

En un grupo de niños con diverso grado de malnutrición y con diarrea moderada o severa, a los que se les administró LGG, la persistencia de la diarrea acuosa a las 48 horas es significativamente más baja que en el grupo control, 31 *vs* 75%. Las diferencias no fueron significativas en los niños con diarrea sanguinolenta⁽⁶⁶⁾. También en otro estudio en niños de 6-36 meses ingresados en el hospital por diarrea aguda, los que recibieron *L. reuteri* a dosis de 10^{10} - 10^{11} UFC/día, la persistencia de la diarrea acuosa al segundo día de tratamiento es significativamente más baja que en los controles (26 *vs* 81%)⁽⁶⁷⁾.

En un metaanálisis sobre el tratamiento de la diarrea infecciosa con lactobacilos en niños, que comprende las publicaciones entre 1996-2000 y seleccionados aquellos estudios que estaban bien controlados con distribución aleatoria y carácter ciego, se demuestra que la duración de la diarrea se redujo a 0,7 días (IC del 95%, 0,3-1,2) y que su frecuencia disminuyó en 1,6 deposiciones al segundo día de tratamiento (IC del 95%, 0,7-2,6). Los resultados sugieren que los lactobacilos constituyen un tratamiento inocuo y eficaz en los niños afectados por diarrea infecciosa, sobre todo por rotavirus y que la eficacia se sitúa por encima de la dosis umbral de 10^{10} UFC durante los primeros 2 días. Aunque la mayoría de los estudios han sido en poblaciones de niños

hospitalizados, las conclusiones del metaanálisis cabe hacerlas extensivas a las poblaciones ambulatorias con diarrea. Los beneficios de los probióticos no se limitan a la reducción y frecuencia de la diarrea, sino que también tienen implicaciones socioeconómicas favorables, como su menor coste terapéutico, menos coste en pañales, menos días de asistencia sanitaria y menos días de absentismo laboral de los padres y escolar de los niños^(68,69).

Un trabajo reciente en niños menores de 2 años ingresados con deshidratación moderada y aleatorizados a doble ciego placebo-control, en el que un grupo recibía suero de rehidratación oral y el otro, suero de rehidratación oral con lactobacilos GG, demuestra que el efecto beneficioso de los probióticos sólo se producirá después de la colonización intestinal, y su uso en la diarrea de corta duración, como la gastroenteritis viral es limitado, mientras que sus efectos beneficiosos parecen ser importantes para su uso profiláctico en las poblaciones de alto riesgo⁽⁷⁰⁾.

Es interesante destacar que no todos los probióticos tienen el mismo efecto. Así, la menor duración de la diarrea y la mayor respuesta de Ig A secretora se produce en niños que recibieron LGG con relación a los que recibieron *L. rhamnosus* o una combinación de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii*⁽⁶⁸⁾. Además, el efecto que tienen los probióticos en la prevención y tratamiento de la diarrea por rotavirus, sugiere que el mecanismo principal está más relacionado con el aumento de la defensa inmune local que con la multiplicación de las bacterias amigas.

Diarrea asociada a antibióticos

El uso de antibióticos puede producir diarrea, al alterar el equilibrio de la flora intestinal, con descenso de los lactobacilos y bifidobacterias, que son responsables de la resistencia a la colonización por patógenos, produciéndose infecciones por gérmenes oportunistas, fundamentalmente *Clostridium difficile*, que ha emergido como el mayor responsable enteropatógeno de la diarrea asociada a antibióticos. Otros agentes infecciosos responsables son *Klebsiella oxytoca*, *C. perfringens*, *S. aureus*, *Candida* spp y *Salmonella* spp. Alrededor de un tercio de los niños que recibe antibióticos de amplio espectro (fundamentalmente aquellos que actúan en anaerobiosis, especialmente aminopenicilinas, una combinación de aminopenicilinas y clavulánico, cefalosporinas y clindamicina), pueden desarrollar desde una diarrea

leve a una colitis pseudomembranosa fulminante. El uso de probióticos se ha convertido en una alternativa beneficiosa, para evitar o minimizar el efecto de los antibióticos sobre la flora, y para disminuir el número de recurrencias por *Clostridium difficile*. Estudios bien controlados en niños de 6 meses a 10 años tratados con antibióticos orales (amoxicilina, amoxicilina y clavulánico o cefalosporinas) por infecciones agudas respiratorias (otitis, faringitis, bronquitis y sinusitis), urinarias, de tejidos blandos y piel y a los que se les administra simultáneamente LGG en cápsulas (2×10^{10} UFC/día), presentaron menor incidencia de diarrea (8 vs 26%, $p < 0,05$), menor duración (4,70 vs 5,88 días, $p < 0,05$) y menor severidad (menos frecuencia de deposiciones y más consistencia de las mismas: 17% vs 48%, $p < 0,02$) con relación al grupo placebo^(42,71-74). En otro grupo de niños, de edad media 4-5 años, a tratamiento antibiótico por enfermedad respiratoria aguda, la incidencia de diarrea en los que recibieron LGG a dosis de 2×10^{10} UFC/2/día es del 5%, mientras que en el grupo placebo es del 16%, una diferencia significativamente alta⁽⁷⁵⁾.

En niños de 1-4 años con diarrea persistente por *C. difficile* con toxina B positiva en heces, la administración de *S. boulardii* a dosis de 500-1.000 mg/día hace que en el 95% cedan los síntomas a la primera semana, a los 15 días desaparece la toxina B de las heces y que el 11% tengan recaída, que se resuelve con un segundo tratamiento⁽⁷⁶⁾. LGG también ha sido exitoso en el tratamiento de las recaídas por *C. difficile*⁽¹⁴⁾.

En un reciente metaanálisis de publicaciones comprendidas entre los años 1996 y 2000, para estudiar el efecto de los probióticos en la prevención de la diarrea asociada a antibióticos, se pone de manifiesto que tanto los lactobacilos como el *S. boulardii* son beneficiosos. La *od* ratio en favor del tratamiento con probióticos sobre el placebo es de 0,39 (95% de confianza, 0,25-0,62; $p < 0,001$) para el *Saccharomyces* y de 0,34 (0,19-0,61, $p < 0,01$) para *Lactobacillus*. Los autores concluyen afirmando la necesidad de valorar los costes y el uso rutinario de estos agentes a través de estudios de larga duración, en los que los probióticos sean usados como agentes preventivos⁽⁷⁷⁾.

Diarrea del viajero

Un porcentaje importante de viajeros que visita áreas geográficas de alto riesgo infeccioso, desarrollan diarrea

aguda, aunque en la mayoría de los casos es limitada y poco severa. La antibioterapia es una profilaxis efectiva, pero no es recomendable su uso generalizado, por lo que la existencia de alternativas terapéuticas es importante. El uso de probióticos se ha manifestado como preventivo en algunos estudios, pero en otros no. La administración de *L. rhamnosus* y, en especial, *S. boulardii* ha demostrado alguna efectividad, lo que puede indicar distintos mecanismos de acción entre la levadura y la bacteria probiótica^(78,79).

Diarrea como complicación de la alimentación parenteral en pacientes críticamente enfermos

Los pacientes críticamente enfermos frecuentemente presentan fallo multiorgánico, infecciones y reciben antibióticos de amplio espectro. El tipo de dieta occidental que reciben habitualmente, en muchas ocasiones favorecedora de una escasa combinación de bacterias “buenas”, junto a la nutrición parenteral hace a los pacientes más susceptibles a la infección, al alterar los procesos normales de digestión, favorecer la atrofia de la mucosa intestinal y la traslocación microbiana colónica.

Sin embargo, la administración lo más precoz posible de una alimentación enteral, aporta compuestos no digeribles con efecto prebiótico, favoreciendo la adhesividad de las células “natural killer”, el número de linfocitos y la respuesta a la estimulación antigénica, el crecimiento de flora probiótica y además aportan nutrientes, como ácidos grasos de cadena corta, ácidos grasos poliinsaturados, aminoácidos, poliaminas, vitaminas, antioxidantes, factores de crecimiento y factores de coagulación al ecosistema intestinal. Una revisión de los artículos publicados entre 1980 y 2001 sobre uso de probióticos ofrece resultados contradictorios. La insuficiente evidencia de su beneficio, no aconseja de momento su uso rutinario⁽⁸⁰⁾.

Enterocolitis necrotizante neonatal (NEC)

Es un síndrome adquirido que afecta al tracto gastrointestinal, que se presenta, fundamentalmente, en recién nacidos pretérmino y de bajo peso al nacimiento. Es definida como una necrosis isquémica inflamatoria del intestino, en cuyo desarrollo confluyen la colonización bacteriana del tracto intestinal, la disponibilidad de un sustrato nutricional, en especial leche de fórmula, que favorecen el crecimiento bacteriano y el desarrollo de la isquemia. Ello indu-

ce una cascada inflamatoria con incremento de los niveles séricos de citocinas, como IL-6, TNF- α , factor activador plaquetario (PAF) y óxido nítrico (NO), favoreciendo la apoptosis del villi intestinal. Niveles elevados de PAF y bajos de PAF acetilhidroxilasa, la enzima que degrada al PAF, inducen necrosis intestinal⁽⁸¹⁾.

El menor riesgo de desarrollar NEC en recién nacidos alimentados con leche de mujer está en relación con su contenido de factores inmunoprotectores, inmunomoduladores, antimicrobianos y antiinflamatorios. Por el contrario, en los alimentados con leche de fórmula infantil predominan las bacterias *E. coli*, bacteroides y otros anaerobios y menos bifidobacterias. Por ello, una alternativa preventiva-terapéutica de la NEC sería evitar el crecimiento de patógenos, administrando probióticos para colonizar el intestino con flora no patógena. Estudios en experimentación animal demuestran que la administración de bifidobacterias colonizan el intestino y disminuyen significativamente el riesgo de NEC. En recién nacidos, la administración de LGG (6-10⁹ UFC/día) es efectiva en la colonización intestinal y reduce el riesgo de NEC. De la misma forma, en recién nacidos de unidades de cuidados intensivos la administración de *L. acidophilus* 2,5x10⁷ UFC y *B. infantis* 2,5x10⁷ UFC/día disminuye significativamente la incidencia de NEC con relación al grupo placebo 2,8 vs 6,6%, $p < 0,0002$ ^(82,83).

Síndrome de crecimiento bacteriano del intestino corto

Es una complicación común del síndrome del intestino corto o pseudoobstrucción intestinal, aunque puede ocurrir también en ausencia de defectos anatómicos o funcionales. El síndrome se caracteriza por distensión abdominal, diarrea intratable y malabsorción. La administración de terapia probiótica con *L. plantarum* 299V y LGG ha sido exitosa en estos pacientes. Pero debe tenerse en cuenta que una complicación del síndrome es la acidosis láctica, que está ligada a la actividad metabólica intraluminal de algunos lactobacilos, que producen D-lactato que no puede ser metabolizado. Por ello, es importante que los lactobacilos a administrar produzcan L-lactato, como ocurre con el LGG, que desplazan a las bacterias que producen D-lactato, no desarrollándose en consecuencia los episodios de acidosis. El uso de LGG a dosis de 2x10¹⁰ UFC/día durante 18 meses evitó la aparición de episodios^(84,85).

Colon irritable

La administración de lactobacilus a pacientes con colon irritable, mejora su estado clínico con una disminución del dolor y la distensión abdominal⁽⁸⁶⁾.

Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

La predisposición genética, las alteraciones inmunológicas y las bacterias patógenas interactúan como agentes desencadenantes y perpetuadores de la enfermedad inflamatoria intestinal. Así, la patogénesis de la EII en especial de la enfermedad de Crohn está relacionada con la disregulación de la respuesta inmune de la mucosa intestinal a los antígenos. La tolerancia a la propia flora intestinal está descendida, existiendo una menor concentración de bifidobacterias y una mayor de microorganismos patógenos como *Klebsiella* o *Bacteroides vulgatus*. La administración de probióticos, como una terapia de antagonismo bacteriano, es capaz de desplazar a las bacterias con potencial patógeno, con el subsiguiente aumento de bifidobacterias, modificando favorablemente la inadecuada o exagerada respuesta inflamatoria, mejorando el epitelio intestinal y disminuyendo los síntomas⁽⁸⁷⁾. Así, mientras las bacterias patógenas inducen en las células epiteliales intestinales la expresión de citocinas proinflamatorias, como la IL-2,6,8, el TNF- α y el MCP-1, los probióticos estimulan al TNF- β implicado en la regulación de la barrera intestinal^(48,88-92).

En animales deficientes en IL-10 y en receptores de células T se desarrolla espontáneamente colitis en presencia de bacterias luminales, pero no si el intestino está libre de gérmenes. En ellos se demuestra una menor concentración de lactobacilos, una mayor traslocación bacteriana y un mayor número de bacterias adheridas a la mucosa. Estos estudios demuestran que el tratamiento con *Lactococcus lactis*, probiótico obtenido por ingeniería genética, que secreta IL-10, es exitoso en la colitis⁽⁹³⁾. Otros estudios observan que la administración de *L. reuteri* R2LC y *L. plantarum* DSM 9843 se asocia a una menor permeabilidad intestinal, traslocación bacteriana y concentración de endotoxinas y mejoría clínica.

En niños y adultos, la administración de LGG, *L. plantarum*, *L. brevis*, *E. coli* no patógeno, *Bifidobacterium adolescentis* y *S. boulardii* no produce el efecto proinflamatorio de los patógenos y sí uno antiinflamatorio, que mejora los síntomas y prolonga la remisión de los mismos. Esto se pone de mani-

fiesto en un reciente estudio en niños de 10 a 18 años con enfermedad de Crohn, con un índice de actividad >10 (PCDAI), a los que se les administra durante 24 meses LGG a dosis de 10⁷-10⁹UFC/g, descendiendo significativamente la permeabilidad intestinal, mejorando la clínica y descendiendo el índice de actividad a 5. En interesante destacar los efectos positivos de una preparación probiótica, consistente en la combinación de 3 especies de bifidobacterias, 4 cepas de lactobacilos y 1 cepa de estreptococos, en el mantenimiento de la remisión de la colitis ulcerosa y bursitis y en la prevención de la recurrencia postoperatoria de la enfermedad de Crohn^(89,90,94).

En el nuevo diagnóstico de la EII se involucra el análisis del patrón de citocinas intracelulares en sangre periférica, para diferenciar enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, con un predominio de citocinas tipo 1 en la primera y tipo 2 en la segunda. Estos estudios han sido realizados, fundamentalmente en adultos después de varios años de enfermedad y de varias intervenciones terapéuticas, hipotetizando la posible influencia de estos factores en dichos patrones. Para valorar esta posibilidad se han estudiado niños en fase inicial de la enfermedad, demostrándose diferencias con los patrones de citocinas del adulto. Esto hace pensar que el perfil inflamatorio en células de sangre periférica es variable, dependiendo del tiempo de evolución de la enfermedad y de las terapias utilizadas. Por tanto, sería importante determinar cual es la mejor terapia en el momento del diagnóstico de la enfermedad en el niño y el papel de las distintas cepas de probióticos naturales u obtenidas por ingeniería genética, en la modificación del patrón inflamatorio y en la respuesta a las intervenciones terapéuticas en las dos variedades de presentación de EII⁽⁹⁵⁾.

Infección por Helicobacter pylori (HP)

Es un patógeno gam-negativo responsable de la gastritis tipo B, úlcera péptica y cáncer gástrico. Tanto en experimentación animal *in vitro* como en humanos se ha demostrado que algunos probióticos son antagonistas del *Helicobacter pylori* (HP), inhibiendo su colonización gástrica e impidiendo el desarrollo de la patología relacionada. Así, los *Lactobacillus salivarius*, *L. johnsonii* y otros inhiben la colonización del HP en la mucosa del estómago y la actividad de la enzima ureasa, necesaria para que el patógeno permanezca en el ambiente ácido estomacal. Por tanto, son eficaces en su erradicación en humanos⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾.

Probióticos, prebióticos, simbióticos y patología extraintestinal

Probióticos e infecciones respiratorias en guarderías

En estudios realizados en niños de 1 a 6 años que asisten a guarderías se demuestra que los niños que reciben leches con *Lactobacillus rhamnosus* GG, presentan menor absentismo escolar por enfermedad ($p < 0,05$), menor incidencia de infecciones respiratorias ($p < 0,05$) y menor utilización de antibióticos ($p < 0,05$) que los niños que reciben leche sin suplementar con probióticos⁽⁶²⁾.

Probióticos y fibrosis quística

El lactobacillus GG administrado a pacientes con fibrosis quística parece estar en relación con la reducción de la incidencia de infecciones respiratorias severas⁽⁹⁹⁾.

Probióticos e infecciones del tracto urogenital

Excluyendo las infecciones de transmisión sexual, la mayoría de las infecciones de la vagina, y vejiga son causadas por microorganismos que son originarios del intestino. Existe una fuerte correlación entre la presencia de comensales, particularmente lactobacilos en la vagina y ausencia de infección y de riesgo de infecciones urogenitales con ausencia de lactobacilos^(100,101).

Algunos probióticos administrados en alimentos o en preparaciones tópicas pueden tener un importante papel en la prevención de las infecciones del tracto urogenital, ya que determinadas cepas de lactobacilos podrían inhibir la acción bacteriana patógena acidificando el medio. La administración oral o vaginal de lactobacilos, es útil en el tratamiento de la vulvovaginitis bacteriana⁽¹⁰²⁾. Así, la administración oral de *L. rhamnosus* GR-1, que coloniza el intestino y la vagina, y *L. fermentum* RC-14 son eficaces en la protección contra la infección del tracto urogenital por *E. coli* y *Enterococcus faecalis*, al disminuir la adhesión de los patógenos a las células uroepiteliales, competir por sus receptores y aumentar la producción de inhibidores del crecimiento de éstos⁽¹⁰⁰⁾. También la aplicación vaginal de cápsulas de lactobacilos cepas GR-1 y B-54 restauran la flora dominante de lactobacilos en la vagina y descienden el riesgo de recurrencia de infección del tracto urinario⁽¹⁰³⁾. Por tanto, el control de las infecciones extraintestinales mediante estrategias diferentes a la antibioterapia, debido al desarrollo de resistencia a cepas patógenas y/o la disminución de la flora pro-

tectora, como es el uso de probióticos representa una alternativa prometedora⁽⁴³⁾.

Probióticos, prebióticos, simbióticos y patología metabólica-nutricional

Protección cardiovascular: perfil lipídico, insulinemia y presión sanguínea

La administración de prebióticos tipo fructanos puede tener un efecto beneficioso sobre el perfil lipídico, actuando por varios mecanismos, como la acumulación directa del colesterol por las bacterias productoras de ácido láctico, favoreciendo la desconjugación de sales biliares, reduciendo la absorción del colesterol y la lipogénesis hepática, lo que ocasiona el descenso de los niveles de CT, LDL-C, VLDL, Tg y Apo B. También tiene un efecto favorable en la glucemia e insulinemia postprandial⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁸⁾.

En estudios recientes en humanos y animales, tanto normo, como hipercolesterolémicos, la ingesta de probióticos como *L. reuteri*, *L. sporogenes*, *S. thermophilus* y *E. Faecium* demuestra un descenso significativo de los niveles de CT, LDL-C, VLDL y Tg y un incremento de HDL-C, de la razón HDL/LDL-C y fibrinógeno^(109,110). La administración de *L. helveticus* y *S. cerevisiae* parece reducir la presión sistólica y diastólica. Consecuentemente el consumo regular de probióticos y prebióticos puede proporcionar un modesto efecto profiláctico contra la enfermedad cardíaca^(7,111).

Intolerancia a la lactosa

Alrededor del 70% de la población mundial, siguiendo un gradiente Norte-Sur, presenta intolerancia a la lactosa, relacionada con la disminución de la actividad de la lactasa en la mucosa intestinal, genéticamente determinada. Como consecuencia, la lactosa no digerida alcanza el intestino distal y es fermentada por la flora colónica, con producción de agua, ácidos grasos de cadena corta y gas, que dan lugar a los síntomas comunes de la intolerancia, como son el dolor abdominal, la flatulencia y la diarrea.

Nuestros estudios en niños, estudiantes de medicina y adultos de Galicia sobre intolerancia a la lactosa, realizando el test de hidrógeno espirado (BH₂) con la administración de diversas cantidades de lactosa y diferentes vehículos (agua, leche y yogur), demuestran que la cantidad y vehículo son importantes indicadores del área bajo la curva de hidrógeno y de los síntomas, pero también ponen de mani-

fiesto que aún con la misma cantidad de lactosa, cuando el vehículo es el yogur, desciende significativamente el área bajo la curva de hidrógeno espirado en relación a la leche y muy especialmente al agua. En consecuencia, los alimentos lácteos fermentados, como el yogur que contiene *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, al favorecer la digestión de la lactosa y la absorción completa de sus monosacáridos, glucosa y galactosa hacen desaparecer o aliviar los síntomas gastrointestinales de intolerancia. Esto parece debido a que aproximadamente un 25-50% de la lactosa contenida en el yogur es hidrolizada a ácido láctico durante el proceso de fermentación, a que los lactobacilos producen lactasa (β -galactosidasa), que facilita la hidrólisis de la lactosa en el tracto gastrointestinal, y a que el tiempo de tránsito intestinal está disminuido tras la ingesta de yogur en comparación con la de leche^(18,42,112). Es de destacar, que la eficacia de la acción de los probióticos del yogur en la intolerancia a la lactosa está condicionada por la integridad de la pared bacteriana, ya que actúa como una protección mecánica de la lactasa durante el tránsito gástrico, permitiendo su liberación en el intestino delgado. Así, al comparar la eficacia de la ingesta de yogur con gérmenes viables, muertos por irradiación con pared intacta o muertos y centrifugados con pared rota, se demuestra que ésta es similar entre gérmenes vivos y muertos con pared intacta, pero significativamente superior que cuando está rota. Además, los productos lácteos fermentados favorecen también la absorción de calcio y su biodisponibilidad⁽¹¹³⁻¹¹⁵⁾. La administración de leches con lactobacilos y bifidobacterias mejoran también la digestión de lactosa, favoreciendo su tolerancia⁽¹¹⁵⁻¹¹⁸⁾ (Tabla V).

En niños con deficiencia de sacarasa, se ha observado una mejor digestión de sacarosa al consumir *Saccharomyces cerevisiae*, aun cuando su importancia en el tratamiento de la deficiencia de sacarasa no esté bien establecido⁽⁴²⁾.

Micronutrientes y prebióticos y probióticos

La administración de prebióticos (inulina, oligofruktosa, glucooligosacáridos y galactooligosacáridos) parece estimular la absorción y retención de varios minerales y mejorar la mineralización ósea. La mayoría de las evidencias científicas de este efecto se obtienen en experiencias en animales, donde se demuestra una mayor absorción y biodisponibilidad, especialmente de calcio y, en menor proporción, de magnesio, zinc e hierro. Así, la oligofruktosa previene la pérdida de estructura trabecular en ratas avariectomizadas, especialmente cuan-

TABLA V. PREVALENCIA DE MALABSORCIÓN A LA LACTOSA EN NIÑOS DE GALICIA⁽¹¹⁸⁾

	Test de hidrógeno espirado (BHT)		
	2 g/Kg peso		
	≤ 50 g lactosa 250 mL agua	≈12 g lactosa 250 mL leche	≈12 g lactosa 250 mL yogur
BHT			
≥ 20 ppm H ₂	36,4''	6,8	1,4
Area bajo la curva (ppm H ₂)	273	195	124
Síntomas tras la ingesta	47,4	16,7	0,0

do la ingesta de calcio es alta y su efecto estimulante sobre el metabolismo óseo es dosis dependiente⁽¹¹⁹⁻¹²¹⁾. Estos hallazgos se demuestran recientemente en algunos, pero no en todos los estudios en humanos. Los hallazgos contradictorios parecen debidos a que los efectos de los prebióticos sobre el metabolismo óseo podrían ser dependientes del tipo de carbohidrato, del índice de fermentación por la flora intestinal, de la dosis ingerida, del tiempo de administración, del contenido de calcio en la dieta, de la parte del esqueleto estudiada y de la edad del sujeto⁽¹¹⁹⁻¹²²⁾.

La administración de probióticos (*L. bulgaricus*, *B. longum*, *S. thermophilus*) también parece tener importantes beneficios en la absorción de minerales, en la síntesis de ácido fólico, de vitaminas B₆ y B₁₂ y en su biodisponibilidad al favorecer la hidrólisis de proteínas y grasas⁽⁷⁾. Favorece también la producción de ácidos grasos de cadena corta con funciones energética, de integridad y función de la mucosa colónica y mantenimiento del pH adecuado en el marco colónico, que es crítico en la expresión de enzimas bacterianas y metabolismo de carcinógenos.

Probióticos, alergia y vacunas

La prevalencia de la enfermedad atópica se ha incrementado notablemente, afectando por lo que se refiere a la dermatitis al 15-20% de los niños de los países desarrollados, siendo urgente establecer estrategias de prevención primaria⁽¹²³⁾.

La administración de leche de mujer, además de ser el patrón de oro de la alimentación para un óptimo crecimiento y desarrollo de los lactantes, proporciona protección inmunológica en un período crítico de la vida, donde sus meca-

nismos de defensa son inmaduros. Así, durante los primeros meses de vida desciende la producción endógena del factor de crecimiento transformador β (TGF- β), elemento clave inmunorregulador de la estimulación de la producción de IgA y la inducción de la tolerancia oral. La leche de mujer constituye una fuente exógena muy importante, como lo demuestra el hecho de que la concentración de TGF- β en el calostro se correlaciona con la capacidad del lactante para producir anticuerpos IgA contra antígenos de la dieta y previene la enfermedad atópica durante el período exclusivo de lactancia materna⁽¹²⁴⁾.

Como la enfermedad atópica tiene un fuerte componente hereditario, la atopia materna constituye un riesgo para el lactante. La administración de probióticos a las mujeres durante el embarazo y la lactancia debe conferir una capacidad inmunomoduladora adicional en la protección de la enfermedad atópica de su hijo. Así, cuando se administra durante el último mes de embarazo y en el período de lactancia a mujeres con historia familiar de atopia *Lactobacillus rhamnosus* cepa GG (ATCC 53103) a dosis diaria de 2×10^{10} UFC o placebo, se demuestra un aumento significativo de la concentración del factor antiinflamatorio TGF- β_2 (2.885pg/mL en la leche de madres que reciben el probiótico *vs* 1340pg/mL en el grupo placebo, $p < 0,018$) y el riesgo de desarrollar eczema atópico en sus hijos durante los primeros dos años de vida se reduce significativamente (15 *vs* 47%, $p < 0,0098$). Además, sólo el 25% de los hijos de madres que recibieron probióticos tienen recaídas del eczema frente al 55% de los placebo ($p < 0,065$). Los lactantes que más se benefician son aquellos con las concentraciones de Ig E en la sangre del cordón más elevadas, ($> 0,5k U/L$), reflejo de la sensibilización atópica en útero, como demuestra la alta concentración de TGF- β_2 en la leche de las madres que reciben probiótico en relación a las de placebo (5.085pg/mL *vs* 1136pg/mL, $p < 0,021$). Estos hallazgos ponen de manifiesto que los probióticos ejercen sus efectos sobre los mecanismos inmunológicos implicados en el desarrollo de atopia, potenciando los efectos de la leche materna^(23,125-127).

En niños la administración de LGG mejora, tanto la extensión y la intensidad del eczema, como la tendencia a la remisión, demostrándose un incremento de la citocina antiinflamatoria IL-10 y de TGF- β y disminución del TNF α . La administración de LGG adicionada a la fórmula

hidrolizada en niños con afectación inflamatoria intestinal relacionada con alergia a la leche de vaca produce una mejoría de la sintomatología de la dermatitis atópica, acompañada de una menor concentración de TNF- α en heces⁽¹²⁸⁻¹²⁹⁾.

La mayor exposición del recién nacido a organismos nosocomiales por parto, cesárea, nido, etc., limitando, por tanto, el contacto con la flora probiótica del canal del parto, favorece el riesgo de atopia. La evidencia en niños atópicos a los 2 años de edad de una menor colonización por lactobacilos y mayor de coliformes y *S. aureus* pone de manifiesto que una baja tasa en los primeros meses de la vida de bacterias probióticas en relación a los patógenos es un factor importante en el desarrollo de la atopia. Y la reciente demostración de una disregulación en la producción de IL-13 por células T CD4+ de la sangre de cordón, que lleva a una producción de niveles elevados de la misma en lactantes que en el primer año de vida desarrollan enfermedad atópica, junto a la asociación hallada entre el polimorfismo del gen IL-13, niveles séricos elevados de IgE e incremento de riesgo de asma y dermatitis atópica son argumentos que evidencian la necesidad de identificar precozmente a recién nacidos y lactantes con riesgo de atopia, para iniciar su prevención inmediata en la que los probióticos al atenuar la respuesta alérgica e incrementar la respuesta inmune pueden jugar un papel. La alternativa terapéutica potencial para la prevención de la enfermedad atópica que significa el uso de probióticos está, por tanto, relacionada con la precocidad de su administración⁽¹²⁶⁻¹³⁵⁾.

Los probióticos son agentes que potencian el efecto inmunogénico de algunas vacunas orales. Así, la administración de vacuna oral de rotavirus asociada a *L. casei* -GG en lactantes de 2-5 meses de edad produce una mayor respuesta de IgM específica y una mayor seroconversión de IgA y anticuerpos IgA específicos. En experimentación animal se obtiene en crías una protección pasiva mayor contra la diarrea producida por rotavirus, asociada a un elevado nivel de Ig A antirotavirus de la leche de madres lactantes que reciben *B. breve* e inmunizadas con rotavirus con relación a los que las madres reciben placebo. La modificación por ingeniería genética de probióticos y su utilización como vehículos de antígenos, pueden ayudar a inducir la inmunización oral y la tolerancia inmunológica^(136,137).

Cáncer de colon, probióticos y prebióticos

Un número importante de bacterias intestinales producen carcinógenos o compuestos estimuladores de tumores durante su metabolismo, como diacilgliceroles, fecapentanos, nitrosaminas, 7-hidroxi IQ, etc.

En experimentación animal, la administración de lactobacilos y bifidobacterias decrece el número de criptas aberrantes, un marcador de riesgo de desarrollo de cáncer, después de un tratamiento con carcinógenos químicos. En humanos, la administración de probióticos pudiera tener también algún beneficio en la prevención del cáncer colorectal, por sus efectos en la disminución o supresión de la microflora productora de mutágenos y carcinógenos, la producción de antimutágenos y anticancerígenos y la estimulación del sistema inmune. Así, la administración de *L. acidophilus*, *L. casei*, LGG y *B. longum* reduciría el riesgo mutagénico y genotóxico para cáncer de colon, vejiga, etc.^(7,138)

También se ha demostrado en experimentación animal un efecto protector de los prebióticos, que inducen cambios en la población y características metabólicas de las bacterias gastrointestinales, modulan la inmunidad entérica y sistémica y protegen de los efectos de los carcinógenos. La administración de una dieta con oligofruktosa e inulina disminuye la incidencia de criptas aberrantes en el colon distal del ratón, después de la exposición a dimetilhidracina y la incidencia y mortalidad por infecciones entéricas y sistémicas. Los mecanismos patogénicos que justifican el aumento de la resistencia a infecciones por la dieta con prebióticos no fueron aclarados, pero los hallazgos se explican por cambios en la función inmune en respuesta a cambios en la composición y características metabólicas de las bacterias residentes en el tracto gastrointestinal⁽¹³⁹⁾.

Un efecto similar para la protección del desarrollo de criptas aberrantes en el colon de ratas se demuestra con la administración de simbióticos, compuestos por una asociación de *Bifidobacterium longum* e inulina⁽¹⁴⁰⁾.

FITOQUÍMICOS

Los fitoquímicos son componentes funcionales, que se obtienen a partir de las plantas. Son un gran número de compuestos, no nutrientes, biológicamente activos, que actúan como sistemas defensivos naturales, protegiéndolas de infecciones e invasiones microbianas y aportándoles color, aroma

y sabor. Existen más de 2.000 pigmentos de plantas que son fitoquímicos y que se agrupan en clases según a su función protectora y sus características físicas y químicas. Los principales son los terpenos, los fenoles y los tioles.

El papel de los fitoquímicos en la prevención y tratamiento de las enfermedades crónicas, especialmente el cáncer y las enfermedades cardíacas, es el objetivo de gran número de investigaciones científicas actuales. Para proteger contra el cáncer, estas sustancias químicas de las plantas actúan detoxificando las toxinas, los carcinógenos y los mutágenos. Estos mecanismos de detoxificación incluyen la neutralización de radicales libres, la inhibición de enzimas que activan carcinógenos, la inducción de otras que los detoxifican, secuestrando carcinógenos reactivos, bloqueando eventos celulares que son necesarios para la promoción del tumor o pueden actuar en las células, evitando la expresión maligna de células que han sido expuestas a agentes cancerígenos. Numerosos estudios revelan que una dieta rica en frutas y verduras disminuye hasta dos veces el riesgo de cáncer, frente a una dieta pobre en estos alimentos. Además, los fitoquímicos parecen reducir el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria protegiendo a las LDL de la oxidación, reduciendo la síntesis o absorción del colesterol y controlando la presión sanguínea^(141,142) (Tablas VI y VII).

Terpenos

Los terpenos son uno de los principales fitonutrientes, se encuentran en gran número de plantas y actúan como antioxidantes. Una subclase de terpenos son los *carotenoides*, que dan el color amarillo, naranja o rojo a las plantas. Se conocen más de 600 carotenoides. Dentro de éstos, destaca el *licopeno*, sin actividad provitamina A, se encuentra en el tomate, y es un potente antioxidante y destructor de radicales libres, lo que le confiere propiedades antiaterogénicas, ya que inhibe la síntesis de colesterol, incrementa los receptores de LDL y la degradación y regulación de la circulación de LDL⁽¹⁴³⁾. Los resultados del estudio multicéntrico europeo, EURAMIC, en especial los datos de Málaga, donde se demuestra que la concentración de licopeno en tejido adiposo se correlaciona inversamente con el riesgo de infarto de miocardio, confieren al licopeno un papel cardioprotector. Se ha descrito que los varones que comen 10 o más raciones de alimentos ricos en licopeno a la semana tienen un 45% menos de riesgo de desarrollar cáncer

TABLA VI. ALIMENTOS Y COMPONENTES ALIMENTARIOS QUE SE HAN RELACIONADO CON LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES⁽¹⁴¹⁾

Alimento	Componente	Enfermedades
Avena	β -glucanos	Enfermedades cardiovasculares
Soja	Isoflavonas Inhibidores de proteasas Fitoesteroles, saponinas Ácidos fenólicos, ácido fítico	Enfermedades cardiovasculares Cánceres dependientes de estrógenos Osteoporosis Síntomas adversos de la menopausia
Semillas de lino	Lignanós	Cánceres dependientes de estrógenos Enfermedades cardiovasculares
Tomates	Licopeno	Distintos tipos de cáncer Enfermedades cardiovasculares
Ajos	Compuestos organosulfurados	Cáncer gastrointestinal Enfermedades cardiovasculares
Brócoli	Isotiocianatos Indoles	Cánceres dependientes de estrógenos
Cítricos	Limoneno	Distintos tipos de cáncer
Arándanos	Compuesto polimérico no dializable	Cáncer del tracto urinario
Té	Compuestos polifenólicos Flavonoides	Distintos tipos de cáncer Enfermedades cardiovasculares
Vino y uva	Compuestos fenólicos Flavonoides Transresveratrol	Distintos tipos de cáncer Enfermedades cardiovasculares
Aceite de oliva	Ácidos grasos monoinsaturados (n-9)	Enfermedades cardiovasculares Diabetes Alteraciones gastrointestinales
Alimentos con kestosa, nistosa, fructosilnística, oligosacáridos	Kestosa, nistosa, fructosilnística, oligosacáridos	Cáncer gastrointestinal Infecciones gastrointestinales
Pescados	Ácidos grasos poliinsaturados (n-3)	Enfermedades cardiovasculares
Productos lácteos	Probióticos, prebióticos Ácido linoleico conjugado Esfingolípidos Ácido butírico	Enfermedades cardiovasculares Cáncer gastrointestinal Infecciones gastrointestinales Modulador del sistema inmune
Ternera	Ácido linoleico conjugado	Distintos tipos de cáncer

de próstata^(144,145). Los *limonoides* son otra subclase de terpenos (monoterpenos), que se encuentran en los cítricos. Se han descrito como quimiopreventivos, al inducir a las enzimas de las fases I y II de detoxificación hepática. Este sistema detoxifica a los carcinógenos haciéndolos más solubles en agua y facilitando su excreción⁽¹⁴⁶⁾.

Fenoles

Son fitoquímicos que protegen a las plantas de la oxidación. Los *flavonoides* son una subclase de fenoles. Se han descrito más de 800 y son los que dan el color azul, azul-rojizo o violeta. Capturan radicales libres, como el anión

superóxido, el oxígeno e iones metálicos. Uno de los principales flavonoides, la *quercetina*, inhibe la oxidación y citotoxicidad de las LDL. Además, los flavonoides capturan mutágenos activos y carcinógenos, disminuyendo el riesgo de cáncer. Se ha demostrado que los flavonoides fenólicos del vino rojo reducen el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria, al proteger a las LDL de la oxidación e inhibir la agregación plaquetaria. Las *isoflavonas* son una subclase de fenoles, que se encuentran en las judías y otros legumbres, especialmente en la soja. Algunas isoflavonas son *fitoestrógenos o fitoesteroles*, es decir versiones no esteroideas de estrógenos, con funciones, tanto agonistas, como anta-

TABLA VII. ALIMENTOS RICOS EN FITOQUÍMICOS⁽¹⁴²⁾

Clase	Fuente alimentaria
Butiratos	Frutas, vegetales, legumbres
Carotenoides	Vegetales, frutas amarillas y naranjas, vegetales de hoja verde
Dialil sulfuro	Cebolla, ajo, cebolleta, puerro, cebollino
Flavonoides y fenoles	Frutos cítricos, zanahoria, brócoli, perejil, col, pepino, tomate, batata, soja, berenjena, pimiento, patatas, baya, té, manzanas, cebollas, judías, rábanos, vaina de guisante
Indoles	Col de Bruselas, coliflor, espinaca, brócoli, col
Isoflavonas	Semilla de soja y derivados
Isotiocianatos	Col, coliflor, brócoli, col de Bruselas, mostaza, rábano
Flavonoides	Frutos vegetales, vino, té verde, cebollas, manzanas, col rizada, judías
Lignanós	Semilla lino, productos grano entero
Limonenos	Aceite de cítricos
Licopeno	Tomate, pomelo, guayaba, albaricoque
Compuestos organosulfurados	Ajo, cebolla, frutos cítricos, brócoli, col, coliflor, col de Bruselas, cebollino
Terpenos y monoterpenos	Cidro, frutos cítricos, perejil, zanahoria, brócoli, col, coliflor, apio, pepino, tomate, batata, berenjena, pimiento, menta, hiervabuena, albahaca, semilla alca...

gonistas de éstos. Los fitoestrógenos reducen el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria, al disminuir los niveles de colesterol, mejorar la elasticidad arterial y proteger a las LDLs de la oxidación. Los fitoestrógenos de la soja actúan como antioxidantes, bloqueadores de carcinógenos o supresores de tumores y, como en el caso de la *fenisteína*, pueden proteger frente a cánceres hormonodependientes (cáncer de mama y próstata), al reducir la unión del estrógeno al receptor. Además, las isoflavonas podrían tener un efecto beneficioso sobre la estructura esquelética, incrementando el contenido óseo mineral, como se ha demostrado en mujeres postmenopáusicas⁽¹⁴⁷⁻¹⁵⁰⁾. Diferentes estudios epidemiológi-

cos ponen en evidencia el efecto potencialmente protector de los *polifenoles* en la aterogénesis y el cáncer, así se ha demostrado su efecto antioxidante de las LDL en experimentación animal⁽¹⁵¹⁾. Existe evidencia de que el consumo elevado de té podría disminuir el riesgo de cáncer, tanto de mama, como de aparato digestivo⁽¹⁵²⁾.

Tioles

Son fitonutrientes que contienen sulfuro, se encuentran en las crucíferas. Se han identificado como *indoles, ditiolionas e isotiocianatos*, que se obtienen por hidrólisis de los glucosinolatos, catabolizada por la enzima mirosina. Estos componentes organosulfúricos regulan las enzimas involucradas en la detoxificación de carcinógenos y otros componentes extraños. Parece que se relacionan con la menor incidencia de cáncer, especialmente de pulmón, estómago, colon y recto. Los fitoquímicos del ajo, el *alil sulfuro*, y otros parecen prevenir la activación de los carcinógenos. El alil sulfuro incrementa la producción de glutatión S transferasa, una enzima de la fase II de detoxificación hepática, inhibe la mutagénesis e incrementa la actividad de los macrófagos y de los linfocitos T. Un isotiocianato, *el sulforano*, y el *indol-3-carbinol* inducen reacciones de detoxicación y modulan el metabolismo de los estrógenos, pudiendo ser protectores contra el cáncer, muy especialmente el de mama⁽¹⁵³⁾.

Lignanós

Son fitoquímicos que se encuentran en la semilla de lino y en los productos de grano entero. Los lignanos de las plantas son convertidos a lignanos de mamíferos por las bacterias intestinales y tienen propiedades biológicas, que incluyen la actividad antimutagénica y antioxidante. Son fitoestrógenos y pueden tener un efecto protector contra los cánceres hormonodependientes, por su posible interferencia en el metabolismo de las hormonas sexuales⁽¹⁴²⁾.

DIETA RICA EN ALIMENTOS FUNCIONALES. DIETA MEDITERRÁNEA Y ATLÁNTICA.

Hasta finales del siglo XX, la meta en la alimentación humana se relacionaba con asegurar un aporte adecuado de energía y de macro y micronutrientes en la dieta. Hoy está naciendo un nuevo concepto de nutrición, la nutracéutica, el paradigma de la nutrición defensiva, cuyo objetivo es la

prevención de la enfermedad y la promoción de la salud y el bienestar, por tanto, ayudar al organismo a defenderse de las enfermedades crónicas y degenerativas ya desde la infancia. La dieta occidental ha llevado progresivamente a un descenso del consumo de alimentos fermentados, con lo que el aporte de microorganismos es escaso. Paralelamente se ha experimentado también un descenso de aporte de fibra en la dieta, sustrato para la multiplicación de bacterias probióticas. Por ello no es de extrañar que los astronautas que recibieron una dieta baja en fibra y antioxidantes, al retornar a la tierra tenían un número significativamente descendido de bacterias probióticas endógenas. Estos cambios en la dieta coinciden en el tiempo con un incremento notable de enfermedades inflamatorias como alergia, obesidad, enfermedades cardiovasculares y cáncer⁽¹⁹⁾. El consumo de la dieta mediterránea, abundante en cereales, frutas, vegetales, legumbres y aceite de oliva, y la atlántica rica en pescados azules y blancos, la mayoría frescos y naturales, ricos no sólo en nutrientes, sino también en componentes funcionales, se convierte en un desideratum. Además, siempre que sea necesario se deben incorporar otros alimentos de elaboración industrial enriquecidos en componentes funcionales, con propiedades fisiológicas y terapéuticas específicas, es decir, con poder medicinal. Una dieta cada vez más de diseño y adaptada a las particularidades fisiológicas de los individuos y las poblaciones. Un programa nutricional que favorezca desde la infancia el consumo de alimentos predominantemente de origen vegetal, combinado con la realización de ejercicio físico regular y el mantenimiento de un peso saludable tendrá un impacto significativo y positivo en la esperanza y calidad de vida de la población del siglo XXI⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁶⁾.

SEGURIDAD Y BIOMARCADORES EN LA UTILIZACIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES, EN ESPECIAL PROBIÓTICOS

La seguridad y calidad alimentaria es la gran exigencia del siglo XXI. Un buen ejemplo es el de los alimentos probióticos, por su creciente aceptación y demanda por parte de los consumidores, tanto niños, como adultos o ancianos y especialmente en la población con más nivel socioeconómico y educacional. En este mercado emergente de probióticos en Europa (Bélgica, Dinamarca, España, Finlandia, Francia, Holanda, Reino Unido y Suecia) un 65% lo repre-

sentan productos lácteos, ocupando España la 5ª posición. Además, se observa una tendencia hacia el mayor consumo de estos componentes funcionales en productos no lácteos, sólidos y líquidos (ej. *Lactobacillus plantarum* 299v incorporado a zumos de frutas)^(157,158). Este elevado consumo motiva una preocupación en el mundo científico sobre la inocuidad y la seguridad de estos alimentos. La falta de regulación en la comercialización de productos probióticos, la escasez de estudios a largo plazo, la escasez de cepas de lactobacilos y bifidobacterias viables que hayan sido investigadas en profundidad, la falta del establecimiento de una ingesta máxima, segura y permisible o la escasez de biomarcadores de exposición, de respuesta biológica o funcional específica o de mejora de salud o de reducción de riesgo de enfermedad, lo suficientemente fiables y sensibles, son algunas cuestiones que deberán resolverse de la forma más rápida posible, para poder considerar a todos los alimentos probióticos seguros (GRAS) y conseguir así el máximo beneficio para la salud y bienestar^(14,159).

Aunque una reciente revisión de 143 ensayos de probióticos en humanos entre 1961-1998, en los que participaron más de 7.500 personas, pone de manifiesto la no existencia de efectos adversos o secuelas⁽¹⁶⁰⁾. Debe tenerse en cuenta que son microorganismos vivos y teóricamente pueden ser responsables de efectos adversos, como infecciones, alteraciones metabólicas o de inmunomodulación y transferencia de genes. En este sentido, se ha demostrado muy aisladamente fungemia y septicemia en pacientes inmunodeprimidos, pero incluso no inmunodeprimidos, que recibieron *S. boulardii* y lactobacilos y endocarditis en pacientes con válvulas cardíacas artificiales también por lactobacilos. Sin embargo, en un estudio en niños inmunocomprometidos se ha usado con total seguridad *Lactobacillus plantarum*^(1,161-163). Nuevos desafíos en seguridad a largo plazo aparecen, tanto con el conocimiento de que los microorganismos probióticos sólo son retenidos por días o semanas en el intestino, por lo que sus efectos son transitorios, lo que exige la continuidad de su ingesta permanentemente para mantener su valor protector, como con el desarrollo por ingeniería genética de bacterias de diseño con dianas terapéuticas específicas para utilizar ya desde el período neonatal, favoreciendo el desarrollo de una flora saludable de por vida o por el hecho de que bacterias usadas como probióticos pueden servir como huéspedes a genes resistentes a anti-

bióticos, que pueden ser transferidos a bacterias patógenas, por lo que se hace necesario antes de introducir en el mercado un producto con probióticos o en el que se hayan utilizado gérmenes vivos, verificar que las cepas aisladas no contengan genes resistentes transferibles⁽¹⁶⁴⁻¹⁶⁷⁾. También se debe tener presente que algunos productos comerciales con probióticos no tienen bien definida toda su composición bacteriana, por lo que se hace necesario identificar las bifidobacterias y distintas especies de bacilos, así como microorganismos no declarados⁽¹⁶⁸⁾. Todas estas circunstancias ponen de manifiesto que el riesgo cero no existe con microorganismos y, por tanto, la aceptación de que el concepto de probiótico puede tener no sólo efectos positivos, debe ser considerado por los sanitarios y consumidores⁽¹⁶⁹⁻¹⁷¹⁾. El reciente problema de la encefalopatía esponjiforme es un buen ejemplo de la necesidad de un control riguroso y exhaustivo de la seguridad y alimentación^(172,173).

BIBLIOGRAFÍA

- Holman PC, Katan MB. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch Toxicol* 1998; 20: 237-48.
- Clinton SK. Lycopene: Chemistry, biology and implications for human health and disease. *Nutr Rev* 1998; 56: 35-51.
- Roberfroid MC. Concepts and strategy of functional food Science: The European perspective. *Am J Clin Nutr* 2000; E1 (suppl): 1660S-4S.
- Bellisle R, Diplock AT, Hornstra G. Functional food Science in Europe. *Br J Nutr* 1998; 80 (suppl): S3-193.
- Hasler CM. Functional food: Their role in disease prevention and health promotion. *Food Technology* 1998; 52: 62-70.
- Katan MB. Functional foods. *Lancet* 1999; 354: 794.
- Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. *J Am Diet Ass* 2001; 101: 229-238.
- Salmine S, Douley C, Boutron MC. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998; 80: S147-S171.
- Cummings JH, Roberfroid MB, Andersson H. A new book at dietary carbohydrate: chemistry, physiology and health. *Eur J Clin Nutr* 1997; 51: 417-23.
- Bouhnik J, Fluorie B, Dagay-Abensour L. Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modified colonic fermentation metabolism in healthy humans. *J Nutr* 1997; 127: 444-8.
- FAO/WHO. Report of a joint FAO/WHO expert Consultation. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba-Argentina, 2001
- Vanderhoof JA, Young RJ. Probióticos en Pediatría. *Pediatrics* (ed. esp) 2002; 53: 252-4
- Saavedra JM. Clinical applications of probiotic agents. *AJCN* 2001; 73: 1147-51
- Guandalini S, Gupta P. The role of probiotics in gastrointestinal disorders of infancy and childhood. In CR Rähä, FF Rubaliti eds. *Infant Formula: Closer to the Reference. Nutrition Workshop Series. Vol. 47. Supplement Nestec Ltd. Lippincott Williams Wilkuis. Philadelphia* 2002; pp. 29-45.
- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the lumen colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125: 1401-12.
- Gibson GR, Collins MD. Concept of balanced colonic microbiota, prebiotics, and synbiotics. In *Probiotics, Other Nutritional Factors, and Intestinal Microflora*, Hanson LA, Yolken RH eds. Nestlé Nutrition Workshop Series, Vol. 42, Nestec Ltd., Vevey/Lippincott-Raven. Philadelphia 1999; 139-156.
- Roberfroid M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Dig liver dis* 2002; 34 (suppl. 2): s105-s10.
- De Vrese M, Kuhn C, Titze A, Lorenz A, Barth CA, Schrezenmeir J. Are viable microorganisms essential for the enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by the β -galactosidase of fermented milk products?. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (suppl): 490S
- Markowitz JE, Bengmark S. Probiotics in health and disease in the pediatric patient. *Ped Clin N Amer* 2002; 49: 127-141.
- Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L et al. Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *J Nutr* 1999; 129: 113-116.
- Gibson GR, Beatty ER, Wang X et al. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterol* 1995; 108: 975-982.
- Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Approaches for modulating the microbial ecology of the gut (review). *Am J Clin Nutr* 1999; 69 (suppl): 1052-1057.
- 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: 119-21.
- Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N 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* 2000; 30: 61-67.
- Gil A, Rueda R. Interaction of early diet and the development of the immune system. *Nutr Res Rev* 2002; 15: 263-292.
- Newburg DS. Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: S8-S17.
- Lönnerdal B. Effect of nutrition on microbial flora in infants: The role of lactoferrin, iron and nucleotides. En LA Hanson, RH Yolken eds. *Probiotics, other nutritional factors and intestinal microflora. Nestle Nutr Work Ser. Vol 42. Lippincott-Raven. Philadelphia* 1999; pp 189-201
- Coppa GV, Pierani P, Zampini L, Carloni I, Carlucci A, Grabielli O. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatr* 1999; 88 (430): 89s-94s.
- Boehm G, Lidestri M, Casetta P, Jelinek J, Knol J, Negretti F, Stahl B, Marini A. Effect of increasing number of intestinal bifidobacteria on the presence of clinically relevant pathogens. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 4: 36: 578.

30. Boehm G, Lidestri M, Caseta P, Jelinek J, Negretti F, Stahl B, Marini A. Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants. *Arch Dis Child Neonatal*. Ed. 2002; 86: F178-F181.
31. Knol J, van der Linde EGM, Wells JCK, Böckler HM. AN infant formula containing prebiotics changes the intestinal microflora of term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 4: 36: 566.
32. Rego J, Pieltain C, Studzinski I. Growth, weight gain composition and mineral accretion in term infant fed a new experimental formula containing hydrolyzed protein, b-polinstate and prebiotics. *Pediatrics* 2001; 21: 387-96.
33. Schmelzle H, Wirth S, Skopnick H, Radke M. Randomized double blind study of the nutritional efficacy and bifidogenicity of a new infant formula containing partially hydrolyzed protein, a high b-palmitic acid level and nondigestible oligosaccharides. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36: 343-51.
34. Moro G, Minoli I, Mosca M, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, Boehm G. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *JPGN* 2002; 34: 291-295.
35. Langhedries JP, Detry J, Van Hees J, Lamboray JM, Darimont J et al. Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 21: 177-81.
36. Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N. Effect of long term consumption of infant formulas with *Bifidobacterium* (B) and *S. thermophilus* (ST) on stool patterns and diaper rash in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 27: A82.
37. Abi-Hanna A, Moore N, Yolken R, Saavedra JM. Long term consumption of infant formulas with live probiotic bacteria: Safety and tolerance. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 27: A84.
38. Haschke F, Wang W, Ping G, Varavithya W, Podhipak A et al. Los ensayos clínicos demuestran la seguridad y eficacia de la cepa probiótica *Bifidobacterium* Bb12 en las leches de continuación y en los preparados lácteos de crecimiento. *Monatsschr Kinderheilkd* 1998; 146: S26-S30.
39. Argüelles F, Borobio MV, Quero L, Rivero M, Argüelles A. Modificaciones de la flora intestinal con la utilización de prebióticos en lactantes. *An Esp Ped* 2002; 56(suppl. 3): 14.
40. Scholtens P, Alles M, Linde Van der E, Knol J. Introduction of solid weaning foods with added prebiotic oligosaccharides affects the composition of the intestinal microflora. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36: 566.
41. Weaver LT. Improving infant milk formulas: Near the end of the trail for the holy grail?. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36: 307-310.
42. Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (suppl): 430S-6S.
43. Forestier Ch, De Champs Ch, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol* 2001; 152: 167-73.
44. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilomni H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (suppl): 444S-50S.
45. Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *International Journal of Food Microbiology* 1998; 42: 39-44.
46. Wheeler JG, Bogle ML, Shema JJ. Impact of dietary yogurt on immune function. *Am J Med Sci* 1997; 313: 120-3.
47. Schiffrin FS. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 1995; 78: 491-7.
48. Solis-Pereira B, Aattouri N, Lamonnier D. Role of food in the estimator of cytokine production. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 521S-55.
49. Salminen S, Isolauri E, Salminen E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barriers: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; 70: 347-58.
50. Lehto EM, Salmivirta SS. Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* strain GG: spen culture supernate: only a pH effect. *FEMS. Immunol Med Microbiol* 1997; 18: 125-32.
51. Mack DR, Michail S, Wei S. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. Coli* adherence in vitro including intestinal ...gen expresion. *Am J Physiol* 1999; 276: 9419-509.
52. Deplancke B, Gakins HR. Microbial modulation of innate defense: Globet cells and the intestinal mucus layer. *AJCN* 2001; 73: 1131S-41S
53. Perdigon G, Fuller R, Raya R. Lactic bacteria and their effect on the immune system. *Curs Illnes Intest Microbiol* 2001; 2: 27-42.
54. Solis-Pereyra A, Aattoun N, Lemounier D. Role of food in stimulation of cytokine production. *AJCN* 1997; 66: 521S-5S.
55. Arunachalam K, Gill HS, Chandra RK. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium Lactis*. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54: 263-7.
56. Gopal PK, Prasad J, Smart J. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against anal enterotoxigenic *Escherichia Coli*. *Int Food Microbiol* 2001; 67: 207-16.
57. Zopf D, Roth S. Oligosaccharides anti-infective agents. *Lancet* 1996; 347: 1017-21.
58. Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (2 suppl): 393S-398S.
59. Saavedra JM, Banman NA, Dung I. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994; 344:1046-9.
60. Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P. A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J Pediatr* 1999; 134: 15-20.
61. Szajewska H, Kotowska M, Arukowicz JZ, Armńska M, Mikotajczyk W. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J Pediatr* 2001; 138: 361-5.
62. Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, Meurman JH, Poussa T, Näse L, Saxelin M, Korpela R. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ* 2001; 322 (2): 1327-9.

63. Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. Strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 1991; 88: 90-7
64. Guarino A, Canani RB, Spagnuolo MI. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 25: 516-9
65. Guandalini S, Pensahene L, Zikri MA, Dias JA, Casali LG et al. *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea. A Multicenter European Trial. *JPGN* 2000; 30: 54-60.
66. Raza S, Graham JM, Allen SJ. *Lactobacillus* GG promotes recovery from acute nonbloody diarrhea in Pakistan. *Pediatr Infect Dis* 1995; 14: 107-11.
67. Shornikova AV, Casas IA, Isolauri E. *Lactobacillus reuteri* is a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 34: 399-404).
68. Majamaa H, Isolauri E, Sakelin M. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *JPGN* 1995; 20: 333-9.
69. Van Niel CW, Fendtner Ch, Garrison MM. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children. A Meta-analysis. *Pediatrics* 2002; 109: 678-84.
70. Costa-Ribeiro H, Ribeiro TCM, Mattos AP, Valois SS, Neri DA, Almeida P, Cerqueira CM, Ramos E, Young RJ, Vanderhoof JA. Limitations of probiotic therapy in acute, severe dehydrating diarrhea. *JPGN* 2003; 36: 112-115.
71. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL. *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* 1999; 135: 564-81.
72. Saavedra JM. Probiotics plus antibiotics: Regulating our bacterial environment. *J Pediatr* 1999; 135: 535-7.
73. Biller JA, Katz AJ, Flores AF. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 21: 224-26
74. McFarlan LV, Surawicz CM, Greenberg RN. Prevention of beta-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 439-48.
75. Arbola T, Laiha K, Torkkeli S. Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. *Pediatrics* 1999; 104: 64
76. Buts JP, Corthier G, Delmee M. *Saccharomyces boulardii* for *Clostridium difficile* associated enteropathies in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 16: 419-25.
77. D'Sousa AL, Rajkumar Ch, Cooke J, Bulpitt ChJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ* 2002; 324:1361-7.
78. Hilton E, Kolakowski P, Singer C, Smith M. Efficacy of *Lactobacillus* GG as a Diarrheal Preventive in Travelers. *J Travel Med* 1997; 4 (1): 41-43.
79. Kollaritsch H, Holst H, Grobara P. Prevention of traveler's diarrhea with *Saccharomyces boulardii*: Results of a placebo controlled double-blind study. *Fortschr Med* 1993; 111: 152-6.
80. Benjemark J. Gut and immune system: Enteral nutrition and immunonutrients. In: Bane AE, Faist E, Fry D (eds). *SIRS, MODS and MOF Pathophysiology, prevention and therapy*. New York, Springer 2000; pp. 420-37.
81. Ford H, Watkins S, Reblock K. The role of inflammation cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 275-82.
82. Caplan MS, Russell T, Adler L. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 1999; 117: 577-83.
83. Hoyos AB. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral acidophilus and bifidobacterium infantis to neonates in an intensive care unit. *Int J Infect Dis* 1999; 3: 197-202.
84. Vanderhoof JA, Young RS, Murray W. Treatment strategies for small bowel bacterial overgrowth in short bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 27: 155-60.
85. Gupta P, Guandalini S. *Lactobacillus* GG prevents D-Lactic acidosis in short Gut Syndrome. *Gastroenterology* 1999; 116: 886A.
86. Robaek S, Johansson ML, Molin S. Alteration of intestinal microflora in associated with reduction in abdominal bloating and pain with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1231-8.
87. Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001; 48 (5): 609.
88. Campieri M, Gronchatt P. Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or possible therapeutic alternative?. *Gastroenterology* 1999; 116: 1246-9.
89. Malin M, Soumalainen H, Saxelin M, Isolauri E. Promoting of Ig A immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus* 99. *Ann Nutr Metab* 1996; 40: 137-45.
90. Gupta R, Andrew H, Kirschner B. Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease?. Results of a preliminary open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31: 453-7
91. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A double-blind placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000; 119: 305-9
92. Haller D, Rode CH, Herames WP. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine by epithelial cell/leukocyte co-cultures. *Gut* 2000; 47: 79-87.
93. Steidler L, Hans W, Schotte L. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000; 289: 1352-5
94. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999; 354(9179): 635-9
95. Mack DR, Beedle S, Warren J, Davis J, Gross Th. Peripheral blood intracellular cytokine analysis in children newly diagnosed with Inflammatory Bowel Disease. *Pediatr Res* 2002; 51: 328-332
96. Michetti P, Dorta G, Wiesel DH. Effects of whey-culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (Johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion* 1999; 60: 203-9.
97. Canducci F, Armuzzi A, Cremonii T. A lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increase *Helicobacter pylori* eradication rates. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1625-9.
98. Falley CP, Corthesy-Theular I, Rivero JL. Favourable effect of acidified milk (LC-1) on *Helicobacter gastritis* in man. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 25-9.

99. Guarino A. Effects of probiotics in children with cystic fibrosis. *J Gastroenterol* 1998; 11: 91
100. Reid G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (2Suppl): 437s-443s.
101. Reid G, Bruce AW. Selectin of lactobacillus strains for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis* 2001; 183 (S1): 577-80.
102. Reid S, Bruce AW, Fraser N. Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Microbial Immunol* 2001; 30: 49-52.
103. Reid G, Bruce AW, Taylor M. Instillation and estimation of indigierous organisms to prevent recurrence of urinary tract infections. *Microecol Ther* 1998; 23: 32-45.
104. Davidson MH, Maki KC, Sinecki C. Evaluation of the influence of dietary inulin in adults with hypercholesterolemia. *Nutrition* 1998; 18: 503-17.
105. Fiordiliso M, Kok N, Desager JP. Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats. *Lipid* 1995; 30: 163-7.
106. Kok N, Roberfroid M, Robert A, Delzenne N. Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats. *Br J Nutr* 1996; 76: 881-90.
107. Delzenne NM, Kok N. Effects of frutans-type prebiotics on lipid metabolism. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (suppl): 456S-8S.
108. Wangen KE, Duncan AM, Xu X, Kurzer MS. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 325-31.
109. Jackson KJ, Taylor RJ, Clossy AM. The effect of the daily intake of inulin and glucose concentration in middle-aged men and women. *Br J Nutr* 1999; 82: 22-30.
110. De Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhoea, lipid metabolism and carcinogenesis: A review of papers published between 1988-1998. *AJCN* 2000; 71: 405-11.
111. Oxman T, Shapiro M, Klein R. Oral administration of *Lactobacillus* induces cardioprotection. *J Altern Complement Med* 2001; 7: 745-54.
112. De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue Ch, Schrezenmeir J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (suppl): 421S-9S.
113. Suarez FL, Savaiano DA. Diet, genetics and lactose intolerance. *Food Technol* 1997; 51: 74-76.
114. Saavedra JM. Carbohydrate malabsorption. En Brandt LJ ed. *Clinical practice of Gastroenterology*. Philadelphia: Current Medicine Publishers 1999; 1312-18.
115. Shermak MA, Saavedra JM, Jackson TL. Effect of yogurt on symptoms and kinetics of hydrogen production in lactose-maldigesting children. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1003-6.
116. Montes RG, Saavedra JM, Bayless TM. Effect of milks inoculated with *Lactobacillus acidophilus* or a yogurt started culture in lactase-maldigesting children. *J Dairy Sci* 1995; 78: 1657-64.
117. Jiang T, Mustapham A, Savaiano DA. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *J Dairy Sci* 1996; 79: 750-7.
118. Leis R, Tojo R, Pavón P, Douwes A. Prevalence of lactose malabsorption in Galicia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 25: 296-300.
119. Scholz-Ahrens KE, van Loo J, Schrezenmeir J. Long term effect of oligofructose on bone trabecular structure in ovariectomized rats. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (suppl): 498S.
120. Scholz-Ahrens KE, van Loo J, Schrezenmeir J. Effect of oligofructose on bone mineralization in ovariectomized rats is affected by dietary calcium. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (suppl): 498S.
121. Scholz-Ahrens K, Schaafsma G, van den Heuvel E GHM, Schrezenmeir J. Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (suppl): 459S-64S.
122. Van der Heuvel EGHR, Muys T, Van Dokkum OV. Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 544-8.
123. Williams H, Robertson C, Stewart A. Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the intestinal study of asthma and allergies in childhood. *J Allerg Clin Immunol* 1999; 103: 125-38.
124. Kalliomaki M, Ouwehand, Isolauri E. Transforming growth factor- β in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1251-7.
125. Isolauri E, Arvola T, Sutas Y. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1604-10.
126. Ohshima Y, Yasutonu M, Omata N. Dysregulation of IL-13 production by cord blood CD4+ T cells is associated with the subsequent development of atopic disease in infants. *Pediatr Res* 2002; 51: 195-200
127. Graves PE, Kabesch M, Halonen M. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum Ig E levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 506-13.
128. Majamaa H, Isolauri E. Probiotics a new approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 79-85.
129. Kalliomaki M, Salminen S, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 1076-9.
130. Bjorksten B, Naaher P, Sepp E. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year old children. *Clin Esp Allergy* 1999; 29: 342-6.
131. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Aerola E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was or was not developing. *Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 129-34.
132. Murch SH. Tose of allergy reduced by probiotics. *Lancet* 2001; 357: 1057-9.
133. Matsuzaki T, Chin J. Modulatory immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 67-73.
134. Isolauri E. The rationale of probiotic therapy in allergic infants. *Rev Franc Allerg Immunol Clin* 2001; 41: 624-7.
135. McCracken VS, Lorenz RG. The gestational final ecosystem. A precarious alliance among epithelium immunity and microbiota. *Cell Microbial* 2001; 3: 1-11.
136. Isolauri E, Suomalainen H, Lumale M. Improved immunogenicity of oral D \times RRV reasortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 1995; 13: 310-12.
137. Yasui H, Kiyoshima J, Ushihama H. Passive protection against rota-

- virus-induced diarrhea of mouse pup born to and nourished by dams fed *Bifidobacterium breve*. YIT4064. *J Infect Dis* 1995; 172: 403-9.
138. Reddy BS, Rivenson A. Inhibitory effects of *bifidobacterium longum* on colon, mammary and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazol Gunoline a food mutagen. *Cancer Res* 1993; 53: 3914-8.
 139. Buddington KK, Donahoo JB, Buddington RK. Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. *J Nutr* 2002; 132: 472-7.
 140. Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC. Effect of *bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 1998; 19(2): 281-5.
 141. Pérez-Llamas F, Iamora J, Mataix J. Alimentos funcionales. En R. Tojo de. *Tratado de Nutrición Pediátrica*. DOYMA, Barcelona 2001, pp 275-84.
 142. Hasler CM. Functional foods: the western perspective. *Nutr Rev* 1996; 54 (II): S6-S10.
 143. Fuhrman B, Ellis A, Aviran M. Hypocholesterolemic effect of lycopene and β -carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233: 658-62.
 144. Gómez-Aracena J, Sloots J, García-Rodríguez A. Antioxidants and adipose tissue and myocardial infarction in a mediterranean area. The EURAMIC Study in Málaga. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1997; 7: 376-82.
 145. Arab L, Steck S. Lycopene and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71 (suppl): 1691S-5S.
 146. Craig W. Phytochemicals: Guardians of our health. *J Am Diet Assoc* 1997; 97 (suppl 2): S199
 147. Anthony MS, Clarkson TB, Williams JK. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: Potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 1999; 68: 1390S-1393S
 148. Lamartiniere CA. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *Am J Clin Nutr* 2000; 71 (suppl): 1705S-7S
 149. Fritz WA, Coward L, Wang J. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis* 1998; 19: S151-8.
 150. Arjmandi BH, Birnbaum R, Goyal NV. Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 1364S-1368S.
 151. Tijburg LBM, Wiseman SA, Meijer GW. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 1997; 135: 37-48.
 152. Mukhtar M, Ahmad N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1698S-1702S.
 153. Hectit SS. Chemoprevention of cancer by isothiocyanates, modifiers of carcinogen metabolism. *J Nutr* 1999; 129: 769S-774S.
 154. Tojo Sierra R, Leis Trabazo R, Tojo González R. Alimentos funcionales o nutraceúticos. *Rev Esp Pediatr* 2001; 57 (1): 3-12.
 155. Jariwalla RJ. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. *Drugs Exp Clin Res* 2001; 27 (1): 17-26.
 156. Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc* 2001; 101 (2): 229-98.
 157. Stanton C, Gardiner G, Meehan H, Collins K, Fitzgerald G, Lynch PB, Ross RP. Market potential for probiotics. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (2 suppl): 476s-483s.
 158. Molin G. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v1-3. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (suppl): 380s-5s.
 159. Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (Supl. 2): S393-S398.
 160. Milner JA. Functional foods: The USA perspective. *Am J Clin Nutr* 2000; 71 (suppl): 1654S-9S.
 161. Craig WJ. Phytochemicals: Guardians of our health. *J Am Diet Assoc* 1997; 97: S199-S204.
 162. Milner JA. Functional food and health promotion. *J Nutr* 1999; 129: 1395S-75.
 163. US Department of Health and Human Services. Public Health Service. The Surgeon General's report on nutrition and health. Washington DC, US Government Printing Office, 1998 (DHHS publication PHS 88 50210).
 164. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol* 2003; 82(1): 1-11.
 165. Thannock GW, Munro K, Harmsen HS. Analysis of fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2578-88.
 166. Chopra K, Saimi A. Probiotics: potencial pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci* 2002; 13: 1-9.
 167. Walker WA. Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30 (suppl 2): S2-7.
 168. Fasoli S, Marzotto M, Rizzotti L, Rossi F, Dellaglio F, Torriani S. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int J Food Microbiol* 2003; 82(1): 59-70.
 169. Marteau P, Salminen S. Safety of probiotics. En: *Probiotics, other nutritional factors, and intestinal microflora*. LA Hansen, RH Yolken eds. Lippincott-Raven. Nestlé Nutr Work Ser. Vol 42. 1999, pp. 259-69.
 170. Naidu AS, Bidlack WR, Clements RA. Probiotics spectro of lactic acid bacteria. En: *Critical reviewers in food science and nutrition*. FM Clydesdale de. Boca Raton (FL): CRS. Press LLC 1999; pp 13-126.
 171. Hamilton-Miller JM, Shab S, Smith CT. Probiotics remedies are not what they seem. *BMJ* 1996; 312: 55-6.
 172. Ishibashi N, Yamazaki S. Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (2 Suppl): 465s-470s.
 173. Whitley RJ, Mac Donald N, Asher DM and the Committee on Infectious Diseases. AAP. Technical Report: Transmissible Spongiform Encephalopathies: A series for Pediatricians. *Pediatrics* 2000; 106: 1160-5.