

UNIVERSIDAD DE EUROPEA

PROGRAMA DE MÁSTER EN MICROBIOTA, PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS

PROYECTO FINAL DE MÁSTER

Modalidad: Revisión bibliográfica

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE LA CEPA *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG, LGG®* COMO UNA ALTERNATIVA PARA EL DISEÑO DE FÓRMULA Y PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA CON PROBIÓTICOS PARA POBLACIÓN INFANTIL EN EDAD ESCOLAR EN CENTROAMÉRICA

MARIELA HERRERA ZÚÑIGA

UNIVERSIDAD EUROPEA
2021

Directora: Dra. Patricia Ruas Madiedo

RESUMEN

En el presente trabajo se presenta una revisión bibliográfica donde se compilan los beneficios conferidos a la salud del huésped, documentados en estudios clínicos en humanos y metaanálisis otorgados a la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATTC 53103) conocida comercialmente con la abreviatura LGG.

La revisión bibliográfica se enfoca principalmente en los beneficios a la salud documentados en población infantil, buscando como objetivo desarrollar en la región Centroamericana una bebida de base láctea que cumpla con el perfil de formulación de un yogurt infantil, y que incluya en su formulación una concentración de la cepa probiótica que permita mejorar los indicadores de salud de esta población que asiste a centros de cuidado o escuelas, principalmente buscando reducir los cuadros de diarreas agudas infecciosas, frecuencia de prescripción de antibióticos y ausentismo asociado con infecciones del sistema digestivo y/o respiratorio.

Como segunda etapa, posterior a la revisión bibliográfica sobre la cepa, se propone un diseño de proceso industrial para la producción del alimento que garantice la supervivencia de la cepa en el proceso industrial de fermentación de la leche, y que cumpla con la dosis mínima documentada en estudios clínicos para mejorar la incidencia de enfermedades infecciosas antes mencionadas, además se revisa la legislación vigente de acuerdo al Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA,2011) y el Reglamento Técnico Costarricense(RTCR,2013) para la producción y comercialización de este tipo de alimentos.

Finalmente se describe como punto de partida y de forma breve un diseño de estudio clínico que puede ser reproducido localmente para evaluar el beneficio de la bebida probiótica en la población infantil.

ÍNDICE DE APARTADOS

| | |
|---|----|
| Resumen | 1 |
| 1. Introducción general | 3 |
| 2. Objetivos | 11 |
| 3. Capítulo 1: Estudio bibliográfico | 12 |
| 4. Capítulo 2: Propuesta de formulación de un alimento probiótico | 20 |
| 5. Capítulo 3: Propuesta de estudio de intervención | 27 |
| 6. Conclusiones | 29 |
| 7. Bibliografía | 30 |

1. INTRODUCCIÓN

La ingesta de probióticos se ha sugerido para mejorar la salud al estimular la respuesta inmunitaria, entre otros efectos beneficiosos, y al modular beneficiosamente la microbiota intestinal. Se reconoce que la microbiota intestinal humana puede jugar un papel en el desarrollo de enfermedades metabólicas que incluyen obesidad y diabetes, así como enfermedades autoinmunes como la enfermedad inflamatoria intestinal (Kim et al., 2019). La regulación de los probióticos varía entre diferentes países. A menos que hagan declaraciones de propiedades saludables relacionadas con enfermedades específicas, lo cual requiere una regulación específica, los probióticos están considerados como suplementos alimenticios. Muchas propiedades de los probióticos son específicas de la cepa y los hallazgos de seguridad y eficacia asociados a formulaciones específicas no deben generalizarse a otros productos probióticos. Los procesos, las condiciones y los ingredientes de fabricación son determinantes importantes de las características del producto y es probable que los cambios en la fabricación den lugar a un producto que no sea idéntico al "original" en eficacia y seguridad si no se toman las medidas y los controles adecuados (De Simone, 2019).

Los probióticos son definidos como "microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped" De esta definición se desprende que un verdadero probiótico requiere que algunos requisitos previos se cumplan. En primer lugar, los probióticos deben ser microorganismos y estar vivos en el momento de la ingesta. En segundo lugar, deben ingerirse en una dosis lo suficientemente alta como para causar un efecto. La dosis eficaz recomendada está estrechamente vinculada a la documentación clínica, en el que debe basarse. En tercer lugar, los microorganismos vivos ingeridos deben de presentar un efecto beneficioso en el huésped para ser considerado un probiótico. El efecto beneficioso de los probióticos son específicos de cepa y no puede considerarse que el efecto sea general para diferentes especies o subespecies del mismo géneros. El consenso de la especificidad de la cepa se basa en la investigación científica que muestra que varias cepas dentro de la misma

especie pueden mostrar diferentes efectos. Para establecer un verdadero probiótico, por lo tanto, es esencial documentar características de seguridad y eficacia de una cepa probiótica específica (Hill et al, 2014). Las revisiones sistemáticas y los metaanálisis sobre ensayos de intervención controlados, proporcionan evidencia convincente de los beneficios de los probióticos, incluidos los que se vinculan con valiosos aportes para la salud pública, (Hill et al., 2014) siendo una estrategia efectiva para dar forma a un microbiota más saludable.

Se ha sugerido que la composición y función de la microbiota intestinal está asociada con afecciones como alergias, enfermedades inflamatorias intestinales, cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y dislipidemia (Gomes et al, 2014). También se ha sugerido que la microbiota intestinal alterada conduce a una mayor permeabilidad intestinal y a una mayor respuesta inmunitaria de las mucosas, contribuyendo por ejemplo al desarrollo de diabetes. El aumento de la permeabilidad intestinal es el resultado de una reducción de las proteínas de unión estrecha que, eventualmente, favorece la translocación de lipopolisacárido bacteriano (LPS), que puede resultar en endotoxemia metabólica y resistencia a la insulina (Secundulfo et al, 2004).

La modulación de la microbiota intestinal por los probióticos puede facilitar el manejo de una serie de condiciones clínicas. Se sabe que varias enfermedades intestinales como diarrea aguda infecciosa, enfermedad de colon irritable, enfermedad de Crohn y cáncer colorectal están estrechamente asociadas con la disbiosis de la microbiota intestinal generada por el desbalance entre las bacterias intestinales beneficiosas y las dañinas. Una vez que se interrumpe este equilibrio de la microbiota intestinal, pueden provocarse cuadros de diarrea, inflamación e incluso cáncer de colon. Se ha sugerido la administración de probióticos como un enfoque terapéutico para prevenir estos trastornos intestinales. Se reconoce que los probióticos tienen actividad antimicrobiana, antiinflamatoria e incluso anticancerígena, y pueden ayudar a la recuperación de la microbiota intestinal desequilibrada. Esta recuperación también permitiría reducir la incidencia de estas enfermedades intestinales o aliviar sus síntomas. De esta información, ahora se cree que existe una fuerte conexión entre la microbiota intestinal, los

probióticos y la salud intestinal y la enfermedad (Kim et al., 2019). Un ejemplo de esta interacción se muestra en la figura 1.

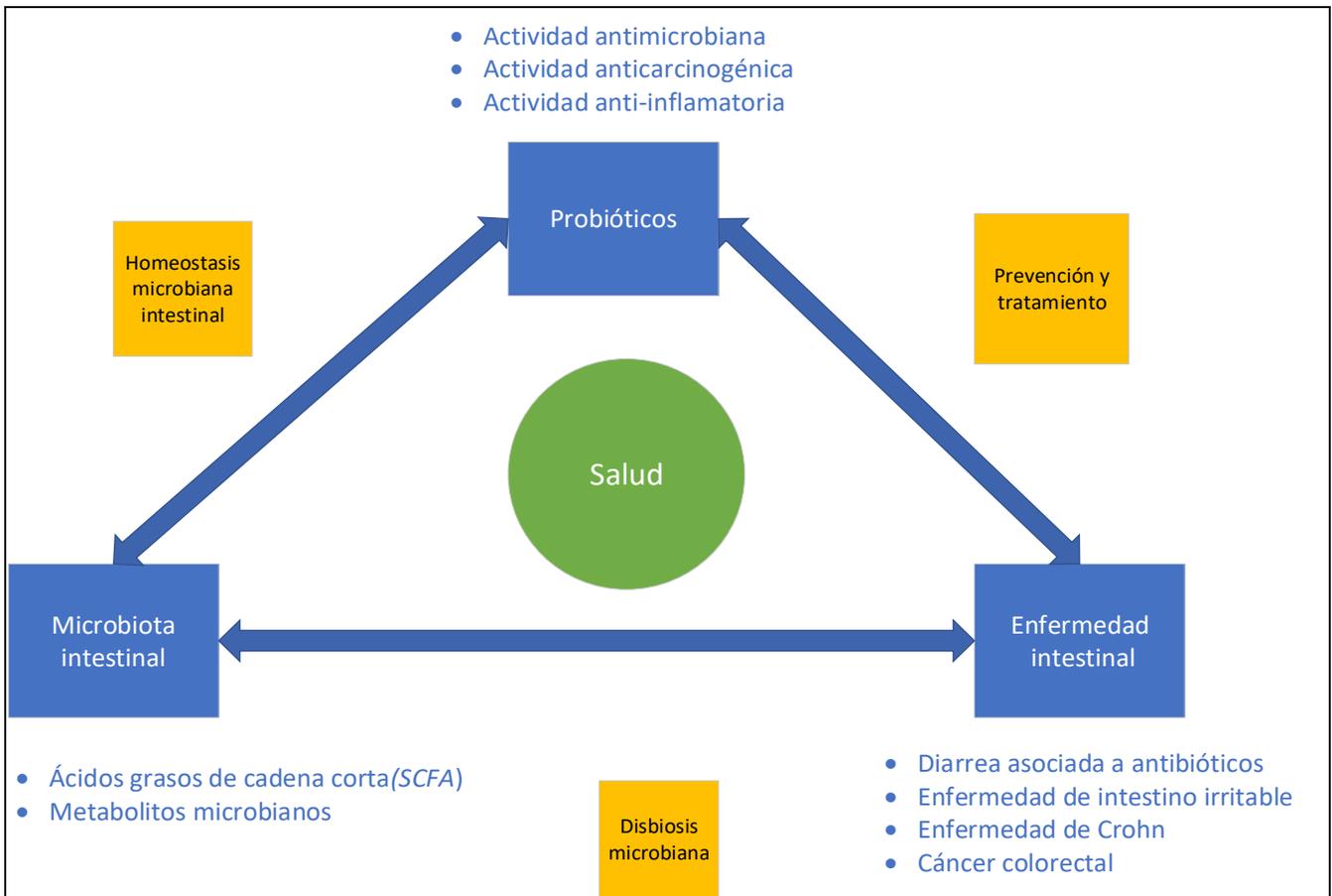


Figura 1. El papel de los probióticos en las enfermedades intestinales mediante la recuperación de la disbiosis en la microbiota intestinal (Fuente: Kim et al., 2019).

Muchos estudios han demostrado que las poblaciones de microorganismos autóctonos de la microbiota intestinal difieren entre individuos sanos y otros con enfermedades o condiciones no saludables. Sin embargo, los investigadores aún no pueden definir la composición de una microbiota humana sana. Ciertas bacterias comensales (como *Roseburia*, *Akkermansia*, *Bifidobacterium* y *Faecalibacterium prausnitzii*) parecen estar asociadas más comúnmente con la salud, pero es un área de investigación activa en la actualidad para determinar si la suplementación con estas bacterias puede mejorar la salud o revertir la enfermedad (Guarner et al., 2017).

Entre los mecanismos de acción de los probióticos (Tabla 2), podemos afirmar que afectan el ecosistema intestinal al afectar los mecanismos de respuesta inmunitarias de la mucosa, al interactuar con potenciales microorganismos patógenos comensales, al generar productos metabólicos finales como los ácidos grasos de cadena corta, y al comunicarse con las células del huésped a través de la señalización química (Tabla 2).

Tabla 2. Mecanismos de interacción probiótico -huésped. La simbiosis entre la microbiota y el huésped se puede optimizar mediante intervenciones farmacológicas o nutricionales en el ecosistema microbiano intestinal utilizando probióticos.

Beneficios inmunológicos

1. Activar los macrófagos a nivel local para aumentar la presentación del antígenos a los linfocitos B y aumentar la producción de inmunoglobulina A (IgA) secretora tanto local como sistémicamente.
2. Modular perfiles de citoquinas
3. Inducir tolerancia a los antígenos alimentarios

Beneficios no inmunológicos

1. Digerir los alimentos y competir por los nutrientes contra los patógenos
2. Alterar el pH local para crear un ambiente desfavorable para los patógenos
3. Producir bacteriocinas para inhibir patógenos
4. Eliminar los radicales superóxido
5. Estimular la producción de mucina a nivel epitelial
6. Mejorar la función de barrera intestinal
7. Competir por la adhesión contra las bacterias patógenas
8. Modificar toxinas derivadas de patógenos

Fuente: Guarner et al.,2017.

Estos mecanismos pueden conducir al antagonismo de los patógenos potenciales, un entorno intestinal mejorado, al refuerzo de la barrera intestinal, a la regulación a la baja de la inflamación y a la regulación y aumento de la respuesta inmunitaria a los desafíos antigénicos. Se cree que estos fenómenos median los efectos más beneficiosos, incluida una reducción en la incidencia y

la gravedad de la diarrea, que es uno de los usos más reconocidos de los probióticos (Guarner et al., 2017).

La importancia de la microbiota intestinal en la salud y la enfermedad es cada vez más evidente, y existe un creciente número de publicaciones sobre el potencial terapéutico de los probióticos en los trastornos gastrointestinales como el síndrome del intestino irritable (SII) y muchas otras afecciones. Los mecanismos de acción propuestos para los efectos beneficiosos de los probióticos incluyen la exclusión competitiva de microorganismos patógenos, la inhibición de la adhesión de patógenos, la producción de sustancias antimicrobianas y la modulación del sistema inmunológico (Hungin, 2018). Algunas especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se utilizan más comúnmente como probióticos, pero también se utilizan la levadura *Saccharomyces boulardii*, y algunas especies de *Bacillus* y la cepa Nissle 1917 de *Escherichia coli*. Las bacterias ácido lácticas, incluidas las especies de *Lactobacillus* género que se ha reclasificado recientemente (Zheng et al. 2020) se han utilizado para la conservación de alimentos por fermentación durante miles de años, y, además, potencialmente pueden impartir beneficios para la salud. La fermentación se aplica globalmente en la conservación de una gama de materias primas agrícolas (cereales, raíces, tubérculos, frutas y verduras, leche, carne, pescado, etc.) (Guarner et al., 2017).

Las iniciativas para llevar el beneficio de cepas probióticas a la alimentación de poblaciones desfavorecidas principalmente en países en vías de desarrollo incluyen acciones como *Yoba for Life* (The Yoba for Life foundation, 2015) cuyo aporte permite la producción de yogurt probiótico con una cepa genérica en muy pequeña escala con volúmenes de producción en el ámbito entre 10L/semana hasta 5000L/semana. La misión de la fundación *Yoba for Life* es proporcionar a las comunidades empobrecidas de África un mayor acceso a *Lactobacillus rhamnosus GG* bajo el nombre de *Lactobacillus rhamnosus yoba 2012*, la primera cepa probiótica genérica del mundo (Kort et al., 2015).

El acceso a cultivos probióticos para la fermentación puede contribuir a mejorar la salud y la economía de personas en países de escasos recursos de múltiples maneras:

1. Extensión de la vida útil y de la seguridad alimentaria desde el punto de vista de parámetros microbiológicos.
2. Reducción del deterioro de la leche mediante fermentación controlada.
3. Aumento de propiedades nutricionales de los alimentos fermentados por entrega de bacterias beneficiosas, compuestos bioactivos como vitaminas y componentes secuestradores tóxicos.
4. Prevención y reducción de los episodios de diarrea resultantes de la ingesta de una cepa probiótica.
5. Proporcionar ingresos para locales productores de leche.

En cuanto a la región Latinoamericana, se documentan también algunas iniciativas para darle accesibilidad de este tipo de productos a las poblaciones desfavorecidas utilizando cepas probióticas aisladas localmente y estudiando las cepas involucradas en los procesos de fermentación de bebidas ancestrales autóctonas de regiones andinas y centroamericanas, enfocadas en proveer una solución a infecciones del tracto digestivo y respiratorio de poblaciones locales desfavorecidas- Como ejemplo, tal es el caso del proyecto Proinfant, donde un grupo de investigación de Argentina, Colombia, España, Guatemala, Nicaragua, México y Perú, buscaban desarrollar alimentos vegetales con funcionalidad probiótica para poblaciones infantiles latinoamericanas desnutridas. Este proyecto se propuso aislar estas bacterias utilizando materias primas vegetales y alimentos tradicionales de alto poder nutritivo de Colombia, Nicaragua, México y Perú. Son, en su mayoría, bebidas fermentadas que se producen de forma artesanal por pequeños productores. Muchos de ellos se consumen localmente desde tiempos ancestrales (Ruas-Madiedo, 2021).

2. OBJETIVO

EL **objetivo general** de este Trabajo Fin de Master (TFM) es revisar el procedimiento para el desarrollo de una fórmula láctea fermentada fortificada con la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG®) para población infantil centroamericana en edad escolar como una alternativa accesible de probióticos y proteína láctea. Para ello, se ha estructurado la memoria del TFM en tres capítulos que se corresponden con los siguientes **objetivos específicos**.

Capítulo 1. Estudio bibliográfico

Objetivo 1. Realizar un estudio bibliográfico sobre de la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* y su aplicación en pediatría, identificando sus beneficios asociados con la función inmunitaria y, principalmente, con la reducción de cuadros de diarreas infecciosas agudas e infecciones del tracto respiratorio.

Capítulo 2. Propuesta de formulación de un alimento probiótico

Objetivo 2. Formulación y proceso de producción de producto bajo los lineamientos del Reglamento Técnico Centroamericano para poder ser comercializado como “yogurt bebible con probiótico LGG®”, teniendo en cuenta la dosis diaria requerida asociada al beneficio probiótico, y coste reducido para mantener el concepto de “asequibilidad”.

Capítulo 3. Propuesta de estudio de intervención

Objetivo 3. Proponer un primer diseño experimental para la ejecución de estudio clínico en niños en etapa escolar.

3. CAPÍTULO 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* LGG® , MECANISMOS DE ACCIÓN Y ESTUDIOS CLÍNICOS EN PEDIATRÍA

3.1. Taxonomía *Lactobacillus (Lacticaseibacillus) rhamnosus* LGG.

Zheng et al. han propuesto recientemente una reclasificación del género *Lactobacillus* en 25 géneros (23 de los cuales son géneros completamente nuevos). Algunas cepas probióticas comerciales bien conocidas como *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei* Shirota, o *Lactobacillus plantarum* 299v tendrán sus nombres cambiados. Los nuevos nombres son *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacticaseibacillus casei* y *Lactiplantibacillus plantarum*, respectivamente (Gomes et al., 2021).

El género *Lacticaseibacillus* pertenece al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae*, y está constituido por bacterias Gram-positivas, anaerobias facultativas, catalasa negativas, no formadoras de esporas, no móviles, con forma de "bastón" (Figura 2), y productoras de ácido láctico, por lo que forman parte del grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL). Es un género ubicuo, encontrándose en muchos ambientes, por lo que están presentes en alimentos fermentados y sus materias primas tanto de origen animal como vegetal. También se encuentra en diversas localizaciones en animales; en el humano, son componentes muy comunes de la microbiota autóctona del tracto gastrointestinal humano, principalmente el tracto superior, así como en la mucosa vaginal (Zheng et al., 2020). La cepa conocida comercialmente como LGG® se clasificó originalmente como *Lactobacillus acidophilus* y el código de identidad "GG" se debe a los investigadores que la aislaron S.L. Gorbach y B.R. Goldin (Doron, 2005). Tras la reciente reclasificación en 2020 tiene como afiliación taxonómica *Lacticaseibacillus rhamnosus*, que abreviaremos como *L. rhamnosus* de aquí en adelante. La cepa fue depositada en la colección de cultivos americana con el código ATCC53103. Fue originalmente aislada de

muestras fecales de un adulto humano sano y presentaba alta resistencia al pH ácido y la bilis, así como capacidad de adhesión al epitelio intestinal, siendo fácil su crecimiento por lo que fue uno de los primeros probióticos en ser utilizados comercialmente. Desde su descubrimiento, ha sido una de las cepas probióticas más estudiadas, en distintas partes del mundo, y se ha utilizado en una gran variedad de productos probióticos disponibles comercialmente (Segers, 2014).

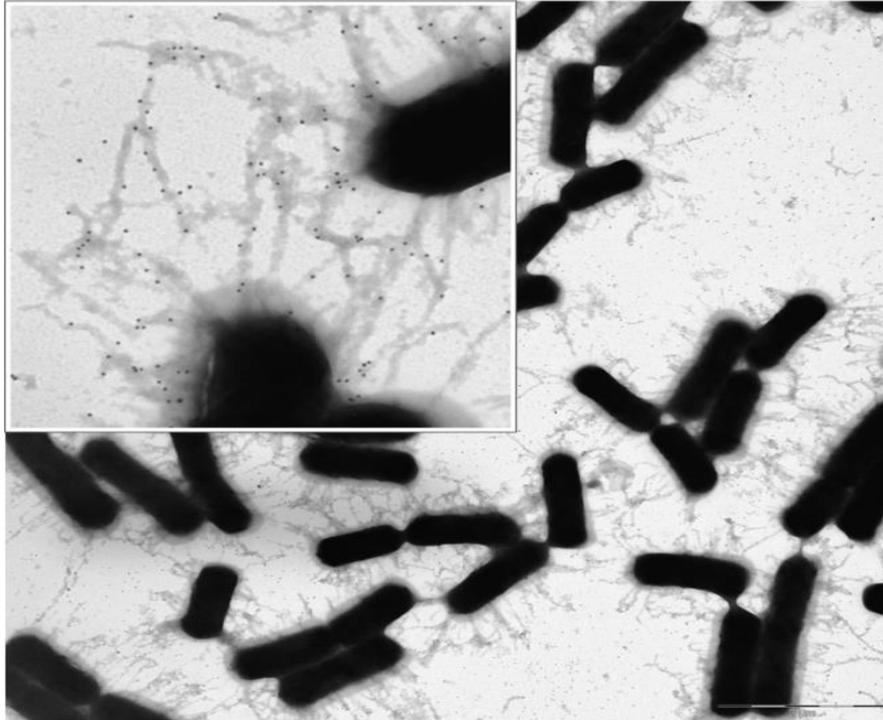


Figura 2. Cepa *L.rhamnosus* GG liofilizada vista al microscopio (Fuente Chr Hansen A/B, 2021)

3.2 Mecanismos de acción de *L. rhamnosus* GG

Según Segers y Lebeer, 2014; se ha propuesto que las bacterias probióticas pueden beneficiar la salud humana principalmente por tres mecanismos generales de acción:

1. En primer lugar, ciertos probióticos pueden excluir o inhibir la actividad de patógenos ya sea mediante acción directa (competición por nutrientes, actividad antimicrobiana, competición por la unión al epitelio, etc.) o indirecta, mediante la modulación de la microbiota beneficiosa.

2. Un segundo mecanismo sería la capacidad para mejorar la función de la barrera epitelial que presentan ciertas cepas probióticas. Esto se puede conseguir modulando intermediarios de vías de señalización celular, como el factor nuclear kappa B (NF- κ B), proteínas quinasa AKT o proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPKs), lo cual conduce, por ejemplo, a la inducción de producción de mucus o al aumento de la formación de las uniones estrechas entre las células del epitelio.
3. En tercer lugar, cepas probióticas específicas también pueden modular las respuestas inmunitarias del huésped, ejerciendo efectos tanto locales (mucosas) como sistémicos.

Muchas de las interacciones entre las bacterias probióticas y las células inmunitarias del epitelio intestinal están mediadas por estructuras moleculares, conocidas como patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), las cuales interactúan con receptores de reconocimiento de patrones específicos (PRRs) de las células eucariotas como, por ejemplo, receptores tipo "toll" (TLR). En relación con la cepa *L. rhamnosus* GG, una de las características clave ampliamente estudiada de esta, y otras cepas, es su fuerte capacidad adhesiva al epitelio intestinal, que ha sido documentada *in vitro* al igual que en estudios *in vivo* con modelos animales y con en seres humanos (Segers and Lebeer, 2014). Se ha demostrado que el *L. rhamnosus* GG es un cepa con excelente adherencia a la mucosa en comparación con otras cepas parecidas como la cepa láctea *L. rhamnosus* Lc705 y otras cepas probióticas como *L. johnsonii* LJ1 y *L. casei* Shirota (Tuomola et al., 1999).

En un estudio de intervención humana se observó que mostraba mayor capacidad de supervivencia en el tracto gastrointestinal en comparación con cepas estrechamente relacionadas como *L. rhamnosus* LC705 (Kainaken et al., 2009). Este estudio concluyó que la presencia de SpaC (proteína de los pili) es esencial para la interacción con la mucosa de *L. rhamnosus* GG y probablemente explica su capacidad para persistir en el tracto intestinal humano por más tiempo que la cepa de LC705 durante el ensayo de intervención. La presencia de pili de unión al mucus en la superficie de una cepa bacteriana Gram-positiva no patogénica

revela un mecanismo previamente no descrito para la interacción de lactobacilos probióticos seleccionados con los tejidos del huésped (Kainaken et al., 2009).

Cuando se alimentó a 76 voluntarios con esta cepa administrada como concentrado congelado o como preparación en leche fermentada o suero de leche, *L. rhamnosus* GG se recuperó en las heces de todos los sujetos que recibieron la leche fermentada o suero de leche y en el 86% que recibió el concentrado congelado cuando se cultivó el espécimen fecal. El organismo también estaba presente en las heces de los sujetos que recibían simultáneamente ampicilina. Después de terminar la alimentación de los voluntarios con el microorganismo, la cepa GG persistió en las heces del 87% de los voluntarios cuatro días después y en el 33% de los sujetos siete días después (Goldin et al., 1992). Es de destacar que la capacidad de colonización de *L. rhamnosus* GG parece ser significativamente mejor en los recién nacidos que en adultos (Sepp et al., 1993).

La comparación genómica de *L. rhamnosus* GG con la cepa LC705, con quien está estrechamente relacionado, dio como resultado la identificación del grupo de genes *spaCBA* implicado en la biosíntesis de los pili SpaCBA específicos de la cepa GG. La confirmación de la síntesis de los pili se realizó por microscopía electrónica de transmisión, mediante marcaje con anticuerpos y partículas de oro (*inmunogold*), y por *western blot*. La primera técnica confirmó que los pili identificados tienen un grosor de alrededor de 5 nm. Adicionalmente, mediante técnicas de análisis mutacional de varios de los genes que codifican estas adhesinas, se comprobó que los pili SpaCBA juegan un papel clave en la adhesión a la capa mucosa y promueven la formación de biofilms (biopelículas) bacterianas en esta localización (Lebeer et al., 2012). Curiosamente, los pili de otras cepas, como *Bifidobacterium breve* UCC2003, parecen ser capaz de expresarse únicamente *in vivo* (en el tracto gastrointestinal murino) y no en condiciones de laboratorio (O'Connell et al., 2011). Se ha comprobado que *L. rhamnosus* GG produce los pili bajo diferentes condiciones de estrés, como sales biliares y pH bajo (Douillard et al., 2013). Es de destacar, que se observan pili más frecuentemente en cepas de aislados intestinales de *L. rhamnosus*, mientras que las cepas que se aíslan de la cavidad oral y de la mucosa vaginal no parecen tener pili

funcionales (Colodner et al., 2003). Los pili parecen funcionar como "nanoresortes" capaces de resistir fuerzas, como el esfuerzo cortante asociado al movimiento de la mucosa, y parecen actuar como una "cremallera mecánica". Se cree que este mecanismo similar a una cremallera puede facilitar una estrecha interacción con el huésped, resultando en una interacción más estable y, por tanto, explicando la mayor capacidad de colonización de *L. rhamnosus* GG (Segers y Lebeer, 2014). Estudios metagenómicos recientes de muestras de microbiota intestinal también muestran que los genes que codifican los pili se encuentran entre los ejemplos más abundantes de funciones identificadas, incluso están presentes en bacterias que presentan baja abundancia, como *Echerichia coli*, lo cual apoya el papel clave que los pili desempeñan en la unión a la mucosa en el nicho intestinal (Arumugan et al., 2011). Dado que los pili parecen jugar un papel importante para la función probiótica de *L. rhamnosus* GG es importante de cara a su producción industrial evitar fuerzas de cizallamiento perjudiciales que faciliten la pérdida de estos apéndices.

3.3 Estudios clínicos con *L. rhamnosus* GG y su uso en pediatría

Más allá de la amplia gama de alimentos probióticos disponibles comercialmente y suplementos, dos proyectos sociales exitosos de alimentos fermentados añadidos con probióticos se están aplicando en Argentina y varios países de África. El programa social argentino (implementado en 2008) se llama "Yogurito escolar", el "probiótico social" y el producto probiótico es yogurt que contiene la cepa *L. rhamnosus* CRL1505 (Villena et al., 2012). El "Programa Social Yogurito" beneficia a unos 300.000 escolares de la provincia de Tucumán y unas 50.000 en otras provincias y municipios de Argentina (<https://isappsscience.org/yogurito>)(Bortz y Thomas, 2017). Este proyecto de transferencia social que mejora la calidad de vida de poblaciones altamente vulnerables es un paradigma de interacción entre el Estado y los sectores científico y manufacturero, a alianza complejo sociotécnico (Bortz y Thomas, 2017).

Parece que *L. rhamnosus* GG puede adherirse al mucus intestinal y sobrevivir en el colon. Biopsias de esta localización incluso sugieren que la colonización continúa por mucho más tiempo que el indicado en los análisis de recuperación fecal. Por otro lado, tras la administración de *L.*

L. rhamnosus GG parece que también puede recuperarse de las amígdalas, la vagina y la cavidad oral, pero no parece tan eficaz como otras cepas de *Lactobacillus* en la colonización de estos nichos (Colodner et al., 2003). Esta escasa colonización podría explicarse por la preferencia (tropismo tisular) que *L. rhamnosus* GG parece mostrar por la mucosa intestinal (Segers and Lebeer, 2014). En este sentido, la presencia de pili en la superficie de esta cepa podría ser clave al actuar como adhesinas, siendo su descubrimiento un gran avance en la comprensión de la excelente capacidad de adherencia de *L. rhamnosus* GG (Reunanen, 2012).

Como tabla resumen se describe en la tabla 3 los principales estudios de intervención del LGG y los resultados obtenidos.

Se ha demostrado que la cepa GG coloniza el intestino de los recién nacidos significativamente mejor que el de los adultos (Rougé, 2009). Uno de los mecanismos de acción de la cepa sería su capacidad para modular la microbiota intestinal en las primeras etapas de la vida. Se ha documentado que la suplementación prenatal con *L. rhamnosus* GG (1.8×10^{10} UFC administrada en cápsulas, diariamente) a partir de la semana 36 de gestación cambia la composición de la microbiota neonatal, promoviendo un perfil beneficioso dominado por bifidobacterias, aunque la diversidad microbiana general no parece cambiar (Gueimonde et al., 2006). ¿Cómo podría promover LGG la colonización por bifidobacterias in vivo? es una de las preguntas que queda por explorar más a fondo en futuros estudios. Dada su excelente y probada capacidad de adherencia a la mucosa intestinal, *L. rhamnosus* GG se ha seleccionado a menudo como probiótico candidato para la prevención y el tratamiento de infecciones gastrointestinales y diarreas, como se describe en las guías de probióticos y prebióticos del 2017 de la Asociación Mundial de Gastroenterología (WGO, 2017).

Tabla 3. Resumen de meta análisis y revisiones sistemáticas que evalúan la eficacia de la administración del *L. rhamnosus* GG en niños. Fuente: Szajewska, H., & Hojsak, I., 2020.

| Autor (Año de publicación) | Variable de Respuesta | Participantes (Edad) | Intervención | Dosis y Duración del tratamiento | Número de ECA (N) | Efecto Estimado (95% IC) |
|---|--|---|---|---|---|--|
| Diarrea aguda o gastroenteritis | | | | | | |
| Florez et al. (2018) | Duración del cuadro de diarrea, frecuencia de deposiciones diarias al día 2, diarrea al día 3, vómito. | Niños (entre 6 meses hasta 86 meses) | LGG comparado con el tratamiento estándar, o con otro probiotico en leche, leche en polvo, disolución oral de rehidratación, agua | No especificado, 6×10^7 hasta 1×10^{12} UCF/día; No especificado hasta que cesó el cuadro de diarrea, 2 hasta 28 días | Duración de la diarrea vrs estándar o placebo(h): 12(2552) Duración de la diarrea en PRA (h): 34 (NR) Duración de la diarrea en PRBYM (h): 86 (NR) Frecuencia de deposiciones solidas día 2: 4(1280) Diarrea en día 3: 2(306) | DM: -22.7 (95% ICr: -28.8, -16.7) DM: -38.00 (95% ICr: -45.43, -30.50) DM: -11.72 (95% ICr: -19.72, -3.80) RO: -0.70 (95% ICr: -1.90, 0.47) RO: 1.61 (95% ICr: 0.53, 4.92) |
| Szajewska et al. (2019) | Duración del cuadro de diarrea, volumen de heces | Niños con gastroenteritis aguda (1 mes a 36 meses, al menos 1 año, 3 meses a 4 años [un estudio], 6 meses a 5 años [dos estudios], 6 meses a 7 años [un estudio]) | LGG comparado con placebo o con no intervención | $1,2 \times 10^8$ a 2×10^{12} UFC/día; La duración del tratamiento no se especificó o varió de <i>ad libitum</i> a 10 días | Volumen de heces (mL/g): 2 (303) Duración de la diarrea (d): 15 (3820) Duración de la diarrea Europa (d): 6 (844) Duración de la diarrea fuera de Europa (d): 9 (2976) | DM: 8.97 (-86.26, 104.2) DM: -0.85 (-1.15, -0.56) DM: -1.22 (-1.73, -0.71) DM: -0.61 (-0.98, -0.25) |
| Diarrea asociada a antibióticos(DAA) | | | | | | |
| McFarland (2015) | Incidencia de diarrea en los dos meses posteriores al uso de antibióticos | Niños que recibieron antibióticos por cualquier razón(NR) | LGG comparado con placebo o con no intervención | 1×10^9 to 1×10^{10} UFC/día; NR | Incidencia de DAA: 4(NR) | RR: 0.44 (0.21, 0.95) |
| Szajewska and Kolodziej (2015) | Incidencia de diarrea o DAA | Niños que recibieron antibióticos por cualquier razón(NR) | LGG comparado con placebo o ninguna intervención en tableta, alimento | 4×10^8 a 3×10^{10} UFC/día; No especificado, | Incidencia de diarrea 5(447) | RR: 0.48 (0.26, 0.89) |

funcional o no
especificado de 10 días a
tres meses

Diarrea nosocomial(DN)

| | | | | | | |
|-------------------------|---|---|---|---|---|---|
| Szajewska et al. (2011) | Incidencia de DN, incidencia de gastroenteritis por rotavirus, incidencia de infecciones asintomáticas por rotavirus, duración de la diarrea y duración de la hospitalización y daños | Niños ingresados en el hospital por cualquier motivo, excluidos los que tenían alto riesgo de infección (de 1 mes a 18 años). | LGG comparado con placebo, en leche, cápsula o en polvo | 1 × 10 ⁹ a 1,2 × 10 ¹⁰ UFC/día. La duración del tratamiento incluyó la duración de la hospitalización más 3 o 7 días de seguimiento después del alta. | DN: 2 (823) Gastroenteritis por rotavirus: 3 (1043) Infección asintomática por rotavirus: 2 (301) | RR: 0.37 (0.23, 0.59) RR: 0.49 (0.28, 0.86) RR: 1.39 (0.74, 2.62) |
| Hojzak et al. (2018) | Incidencia de DN, incidencia de gastroenteritis por rotavirus, incidencia de infecciones asintomáticas por rotavirus | Los bebés y los niños ingresados en el hospital por cualquier motivo, excluidos los recién nacidos y los bebés nacidos prematuramente | LGG comparado con placebo | 1x10 ⁹ a 2x10 ¹⁰ UFC al día; La duración del tratamiento incluyó la duración de la hospitalización más 3 o 7 días de seguimiento después del alta. | DN: 2 (823) Gastroenteritis por rotavirus: 3 (1043) Infección asintomática por rotavirus: 2 (301) | RR: 0.35 (0.19, 0.65) RR: 0.43 (0.17, 1.13) RR: 1.39 (0.74, 2.62) |

Trastornos gastrointestinales funcionales / SII

| | | | | | | |
|-----------------------|--|------------------------------------|---|--|--|---|
| Horvath et al. (2011) | Número de respuestas (disminución de la intensidad del dolor) o cambio en la puntuación de la gravedad | Niños y adolescentes (5 a 17 años) | LGG Comparado con placebo en inulina, polvo o maltodextrina | 6 × 10 ⁹ a 2 × 10 ¹⁰ UFC/día; De cuatro a ocho semanas | Tasa de respuesta (número): 3 (290) Tasa de respuesta SII: 3 (167) Tasa de respuesta al dolor abdominal funcional: 2 (103) Frecuencia de dolor (número de episodios): 2 (240) Frecuencia de dolor SII: 2 (117) | RR: 1.31 (1.08, 1.59) RR: 1.70 (1.27, 2.27) RR: 1.08 (0.77, 1.50) DME: -0.67 (-1.46, 0.13) DME: -1.04 (-1.43, -0.65) DME: 0.06 (-0.33, 0.45) |
|-----------------------|--|------------------------------------|---|--|--|---|

del dolor abdominal

Frecuencia de dolor abdominal funcional: 2 (103) DME: -0.44 (-0.82, -0.05)
 Severidad del dolor (percepción de los padres, escala de caras de dolor): 2 (240) DME: -0.60 (-0.97, -0.23)
 Intensidad del dolor SII: 2 (117) DME: -0.32 (-0.71, 0.07)
 Gravedad del dolor abdominal funcional: 2 (103)

Infecciones respiratorias u otitis media

| | | | | | | |
|---------------------------|---|---|------------------------------------|--|---|---|
| Laursen and Hojsak (2018) | Número de niños con infecciones del tracto respiratorio u otitis media aguda, duración de la infección del tracto respiratorio, días ausentes de la guardería | Niños que asisten a guarderías (3 meses a 7 años) | LGG Comparado con placebo en leche | 1 × 10 ⁸ a 1 × 10 ⁹ UFC/día; 3 o 7 meses | Incidencia de infecciones respiratorias: 3 (1295) Incidencia de otitis media aguda: 2 (794) Duración de la infección respiratoria (d): 3 (1295) Días ausentes de la guardería (d): 2 (794) | RR: 0.81 (0.63, 1.03) RR: 0.71 (0.46, 1.11) RR: -0.78 (-1.46, -0.09) RR: -1.19 (-2.55, 0.16) |
|---------------------------|---|---|------------------------------------|--|---|---|

Abreviaturas: DAA: Diarrea asociada a antibióticos; IMC: Índice de masa corporal; UFC: Unidades formadoras de colonias; IC: Intervalo de confianza; ICr: Intervalo de credibilidad; d: días g, gramos; h: horas; DN: Diarrea nosocomial asociada a la asistencia sanitaria; PRA: Países de ingresos altos; SII: síndrome del intestino irritable; kg: kilogramos; LGG: *L. rhamnosus* GG; PRBAM: Países de renta bajos a medianos; m: meses; m²: metros cuadrados; DM: diferencia de medias; mL, mililitros; mm, milímetros; NR: no informado; RO: razón de probabilidades; ECA: ensayo controlado aleatorio; RR: razón de riesgo o riesgo relativo; DME: diferencia de medias estándar; DMP: diferencia de medias ponderada.

Tres estudios de metaanálisis han evaluado el uso de esta cepa para el tratamiento de diarrea aguda en niños (Szajewska, 2011). Los datos analizados sugieren que *L. rhamnosus* GG puede reducir la duración de diarrea 1,05 días, particularmente en niños europeos, tratados con una dosis alta ($\geq 1 \times 10^{10}$ UFC/día) (Szajewska et al, 2011). Una dosis de 1×10^9 UFC/día administradas mediante leche fermentada con la cepa también demostró que reduce el riesgo de adquirir infecciones gastrointestinales nosocomiales cuando es administrado diariamente en niños hospitalizados según el resultado del metaanálisis. En un estudio con población infantil peruana con cuadros de desnutrición se mostró una menor incidencia de diarrea cuando se trata con la misma cepa ($> 1 \times 10^{10}$ UFC/ día) (Oberhelman et al., 1999). El metanálisis concluyó también que el tratamiento con *L. rhamnosus* GG también puede reducir la frecuencia e intensidad del dolor en niños con trastornos relacionados con el dolor abdominal (Szajewska, 2011).

A modo de resumen, en la Tabla 4 se describen los usos, dosis y nivel de evidencia de efecto beneficioso en pediatría de la cepa *L. rhamnosus* GG recogidas en la revisión de la WGO (Guarner et al. 2017).

Tabla 4. Aplicaciones clínicas de *L. rhamnosus* GG en pediatría indicando el nivel de evidencia científica (Fuente: Guarner et al., WGO Global Guidelines, 2017).

| Diagnóstico/efecto | Dosis (UFC/día) recomendada | Duración de tratamiento | Nivel de evidencia* |
|--|--|--|--------------------------------------|
| Gastroenteritis aguda | $\geq 1 \times 10^{10}$ | 5-7 días | 1 |
| Prevención de diarrea asociada a antibióticos | $\geq 1 \times 10^{10}$ | Durante el tratamiento con antibióticos | 1 |
| Prevención de diarrea nosocomial | $1 \times 10^{10} - 1 \times 10^{11}$ | Dos veces al día | 1 |
| Prevención de infecciones en niños que asisten a centros de cuidado o escuela maternal | 1×10^9 | 3 meses | 1 |
| Prevención de cólico infantil | $1 \times 10^{10} - 1 \times 10^{11}$ | 2 veces al día | 1 |

* Según Oxford Centre for Evidence-based Medicine.

4. CAPÍTULO 2

PROPUESTA DE FORMULACIÓN DE UN ALIMENTO PROBIÓTICO BASADO EN LOS LINEAMIENTOS DEL REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO (RTCA).

4.1. Formulación del producto y viabilidad económica

En la legislación costarricense se define como yogurt el producto obtenido por coagulación y disminución del pH de la leche fluida, recombinada o reconstituida, adicionada o no de otros productos lácteos como leche en polvo, suero en polvo, etc , por fermentación láctica mediante la acción de cultivos protosimbióticos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, a los que en forma complementaria pueden acompañar otras bacterias ácido lácticas que por su actividad, contribuyen a la determinación de las características del producto terminado. Los microorganismos productores de la fermentación láctica deben ser viables y estar presentes en el producto terminado en cantidad mínima de 1×10^7 UFC/g ó UFC/mL (RTCR, 2013. Entre las bacterias lácticas acompañantes se pueden encontrar cepas con características beneficiosas para la salud, cumpliendo también una serie de requisitos como se describe a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Requisitos para uso de probióticos en alimentos. *Fuente:* Consejo de Ministros de Integración Económica Centroamericana RTCA, 2011.

| RTCA ANEXO G | REQUISITOS |
|--------------------|--|
| MICROORGANISMO | Estar vivo, no ser patógeno y su medio natural es el tracto digestivo. Capaz de sobrevivir al tracto gastrointestinal, es decir resistente jugos gástricos y ácidos biliares. Tener capacidad de adherirse a la mucosa intestinal. |
| PRODUCTO TERMINADO | Tener la capacidad de sobrevivir a lo largo de la vida útil del producto terminado. |

RECUENTO MÍNIMO

El alimento debe de contener un número mayor o igual a 1×10^6 UFC/g de bacterias viables de origen probiótico en el producto terminado hasta el final de la vida útil.

ETIQUETADO Y DOSIS DE CONSUMO

Los alimentos que contienen probióticos deben declarar los siguientes aspectos en su etiqueta:

1. El nombre del género, especie y **cepa** de acuerdo con la nomenclatura nacional reconocida.
2. **Consumo recomendado** para que el probióticos sea efectivo con la mejora de salud declarada.
3. Efectos beneficiosos que puedan proporcionar a la salud.

En cuanto a composición del yogurt, el reglamento RTCR, establece un mínimo de proteína, recuentos de bacterias lácticas y probióticas, pH y acidez mínima. En la Tabla 6 se reproduce la información establecida en el reglamento para estos parámetros.

Tabla 6. Parámetros establecidos en el RTCR para yogurt con probióticos.

| Acidez (g ácido láctico/100g yogurt) | Proteínas lácteas (g/100g) | pH | Recuento de bacterias lácticas totales (UFC/g) | Recuento de bacterias probióticas totales (UFC/g) |
|---|---------------------------------------|-----------|---|--|
| 0,6 a 1,5 | Mín 2,7 | Máx 4,8 | Min 1×10^7 | Min 1×10^6 |

Fuente: RTCR, 2011.

Con respecto a los productos con probióticos, incluyendo las leches fermentadas como el yogurt que se encuentran disponibles en los mercados, la guía de Probióticos y Prebióticos de la Organización Mundial de Gastroenterología del 2017, plantea que:

“Las afirmaciones que se pueden hacer sobre estos tipos de productos difieren según la supervisión regulatoria en cada región. Más comúnmente, los probióticos y prebióticos se venden como alimentos o productos de tipo suplemento. Por lo general, no se permite ninguna mención de enfermedad o dolencia, las afirmaciones tienden a ser generales y los productos están dirigidos a la población en general sana. “Productos naturales para la salud” es una

categoría específica de Canadá, donde las autoridades reguladoras aprueban las declaraciones y se permite el uso del producto para controlar enfermedades. En Centroamérica la legislación también permite la comunicación de beneficio siempre y cuando se demuestre mediante la presentación de estudios clínicos aleatorios, doble ciego con control de placebo que existe este a beneficio para la salud y que se cumple con el recuento utilizado en el estudio clínico de la cepa probiótica hasta el final de la vida útil”.

Basándonos en las mismas guías y como complemento a la legislación regional que se establece en el RTCA como requisito para las leches fermentadas con probióticos, es decir la información y recuentos descritos en el cuadro I, se recomienda desde una perspectiva científica una descripción adecuada de un producto probiótico. Por tanto, la etiqueta debe incluir:

1. Identificación de género y especie, con nomenclatura consistente con los nombres científicamente reconocidos actuales.
2. Designación de la cepa.
3. Recuento viable de cada cepa al final de su vida útil.
4. Condiciones de almacenamiento recomendadas.
5. Seguridad en las condiciones de uso recomendadas.
6. Dosis recomendada, que debe basarse en la inducción del efecto fisiológico declarado.
7. Una descripción precisa del efecto fisiológico, en la medida en que lo permita la ley.
8. Información de contacto para la vigilancia post-comercialización.

Se propone en la figura 3 un diagrama de producción para la elaboración del yogurt probiótico para niños y las condiciones de proceso requeridas para garantizar la supervivencia y el recuento de la cepa probiótica *L. rhamnosus* GG.

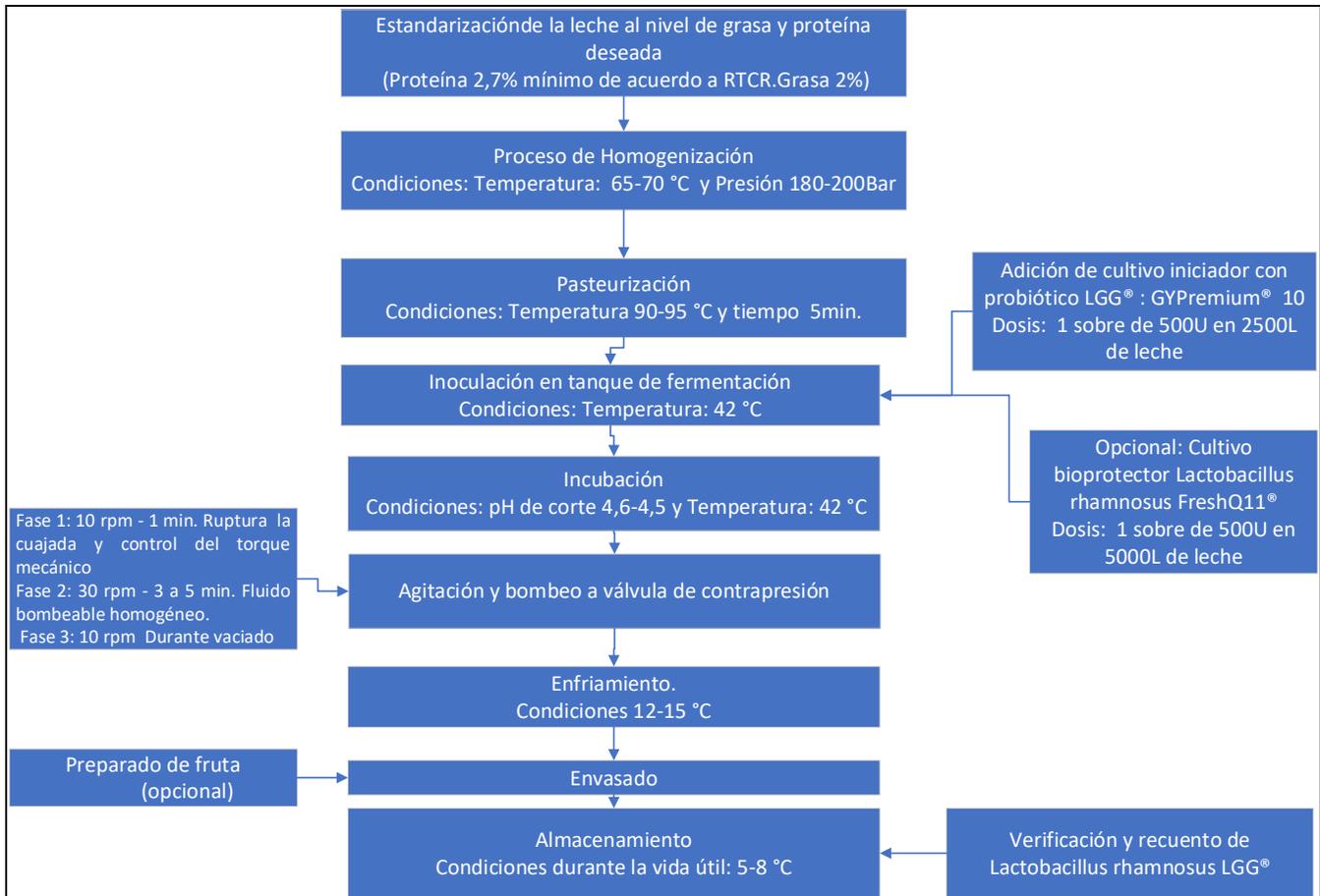


Figura 3. Diagrama de producción propuesto para la elaboración de un yogurt suplementado con la cepa *L. rhamnosus* GG.

En cuanto a la formulación, se propone utilizar una fórmula con 1,5% de grasa y 2,7% de proteína que garantiza el mínimo de proteína establecido por el RTCR, aunque el RTCA acepta un descenso hasta 1,7% de proteína, por ser un producto formulado para niños y niñas se recomienda mantener los contenidos de proteína en 2,7% como mínimo.

Uno de los costos fijos en la producción del yogurt es el material de empaque, que tradicionalmente se lleva a cabo en la región utilizando materiales de plástico PET. Se propone para abaratar costos de venta utilizar como material de empaque bolsas asépticas como las que se muestran en la figura 4, que son tradicionalmente utilizadas en el mercado colombiano como una alternativa de empaque mucho más efectiva para reducir el precio de venta del producto al

consumidor final. Esta alternativa se ha utilizado también en iniciativas de ONGs que buscan incrementar el consumo de yogurt en poblaciones con signos de desnutrición en países en vías de desarrollo (Kort et al., 2015). Se ha de asegurar el envasado en condiciones de esterilidad para mantener la vida útil del producto.



Figura 4. Ejemplo de empaque económico para yogurt de bajo costo comercializado en Colombia. Fuente: Cooperativa Colanta, 2021.

En la Tabla 6 se propone una formulación recomendada para el yogurt que utiliza el cultivo Nutrish® GY-Premium de Chr Hansen (número de material 722310), Nutrish® GY-Premium contiene una mezcla de cultivo acidificante de yogurt *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* y adicionalmente contiene en la mezcla la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus GG* en suficiente cantidad para garantizar recuentos iniciales muy cercanos a 1×10^8 UFC/mL después de la producción y un cultivo bioprotector para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras. La fórmula está basada en la experiencia de trabajo con las condiciones de cadena de frío de la región, incluye un sistema de estabilización que permita mantener la cremosidad del producto como punto clave para el buen perfil sensorial y que cumpla con el contenido mínimo de 2,7% de proteína en producto terminado. Adicionalmente la fórmula propuesta elimina el uso de benzoato sodio y sorbato de potasio en concentraciones hasta 0,03% que se utilizan como preservantes comúnmente en Centroamérica y se reformula con un cultivo bioprotector que utiliza una cepa bioprotectora de *Lactobacillus*

ramnosus(distinta al LGG) capaz de inhibir el crecimiento de hongos y levaduras en el producto. Las sustancias antimicrobianas más importantes y mejor caracterizadas producidas por estas bacterias ácido lácticas son ácido láctico y acético, que son bioactivos en su forma protonada a pH bajo y pueden actuar de forma sinérgica(Siedler et al.,2019) Uno de los mecanismos bioprotectores de estas cepas frente a la alteración por hongos, se ha vinculado a la captura de manganeso libre y podría ser ejercido por lactobacilos en los productos lácteos. La alta absorción de manganeso y el almacenamiento intracelular proporcionan un vínculo con el mecanismo de defensa del estrés oxidativo catalizado por manganeso, no enzimático y diferenciado, para ciertos lactobacilos (Siedler, 2020). El control de hongos es de especial relevancia si, como alternativa, si se utiliza la adición de fruta por separado la formulación (Figura 3).

Tabla 6. Formulación propuesta para el desarrollo del yogurt de niños con un recuento de 1×10^9 UFC/porción, con 40 días de vida útil.

| Ingrediente | %Fórmula (masa/masa) | Cantidad (g) | Precio (\$/kg de materia prima) | Precio por litro de yogurt (\$/L) |
|---|-------------------------|--------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Leche fluida | 87,5 | 875 | 0,50 | 0,438 |
| Concentrado de proteína de suero WPC 35 | 2,35 | 23,5 | 3,80 | 0,089 |
| Estabilizante | 1,2 | 12 | 2,91 | 0,035 |
| Sabor natural vainilla | 0,1 | 1 | 16,50 | 0,017 |
| Cultivo Nutrish GY Premium10* | 0 | 0 | 134,00 | 0,054 |
| Cultivo Bioprotector FreshQ11* | 0 | 0 | 124,00 | 0,025 |
| Agua | 6,35 | 63,5 | 0,002 | 0,000 |
| Azúcar | 2,5 | 25 | 0,53 | 0,013 |
| Totales | 100% | 1000kg | | \$0,670 |
| Costo en USD por fórmula de 100mL | | | | 0,067 |

*Fuente: Asesoría en Alimentos Alfa, 2021; Acueductos y Alcantarillados, 2020, Liga industrial de la caña de azúcar 2021.

** Precios por sobre de 500U. Dosis recomendada: FreshQ® 11 500U para 5000L de leche, Nutrish GY Premium10/ Chr Hansen A/B Dosis : 500U para 2500L de leche.

Con la dosis propuesta de un sobre de Nutrish® GY-Premium 10 (fabricante Chr Hansen A/B) 500U para 2500L de leche, de acuerdo a la validación interna del producto por parte del fabricante se obtendrían recuentos cercanos a que se muestran a continuación en la figura 5. Como práctica de verificación siempre se recomienda validar los recuentos finales en el producto recién fabricado y al final de la vida útil, pues las líneas de proceso, equipos de bombeo, procesos de agitación y trazas de productos de limpieza en las líneas de producción pueden afectar la supervivencia de las cepas.

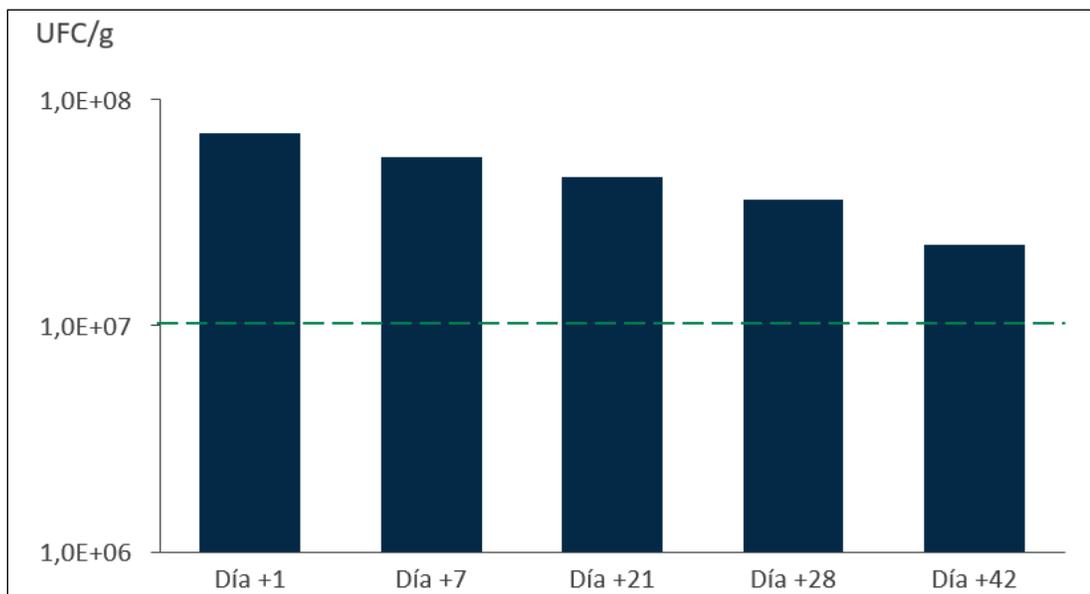


Figura 5. Recuento en UFC/g de LGG® durante 42 días de vida útil con almacenamiento a 5°C, utilizando el cultivo fermentador+ probiótico Nutrish® GY-Premium 10 Base láctea: 1.5% grasa y 4.0% proteína (leche fresca y leche desnatada en polvo).

Nivel de Inoculación 500U/2500L, fermentación a 43°C hasta pH de corte 4.55. Fuente: Chr Hansen, 2021.

5. CAPÍTULO 3

PROPUESTA DE ESTUDIO DE INTERVENCIÓN

Como una segunda etapa, una vez desarrollada la bebida probiótica y habiéndose verificado el recuento del producto en mínimo 1×10^9 ufc/por porción hasta el final de la vida útil del producto, se propone como siguiente etapa reproducir localmente la metodología de evaluación aplicada en 2010 por Hojsak et al, en su estudio clínico doble ciego con control placebo para determinar el beneficio de consumo de esta dosis en 100 mL de leche fermentada en niños y niñas que asisten a centros de cuidado o clases en escuelas públicas, el beneficio estará entonces vinculado a la reducción de cuadros de diarrea aguda infecciosa, reducción de prescripción de antibióticos y reducción de días de ausencias a clases. El estudio debe incluir como elegibles a los infantes de un mismo grupo socioeconómico, que asistan a 4 ubicaciones distintas de la red de centros de cuidado o centros de educación preescolar, se debe reclutar un número de niños para tener suficiente poder estadístico para validar o rechazar la hipótesis o el resultado primario esperado de estudio. Una vez definido el grupo de estudio con estas características se realizará un cálculo estadístico. Se debe obtener el consentimiento legal de sus padres o tutores legales, se debe contar con personal clínico como responsable de la intervención y para el seguimiento de los parámetros a cuantificar y, previamente, se ha de recibir la autorización de un Comité de Ética para llevar a cabo la intervención en el grupo poblacional elegido.

Se debe excluir a los niños con alergia a la leche de vaca, los que tengan enfermedades graves o inmunodeficiencia; y los niños a los que no les gusta fermentados productos lácteos. La entrega de la leche fermentada con probiótico *L. rhamnosus* GG debe de enviarse a las familias antes del inicio de las clases y las infecciones del tracto respiratorio inferior deben ser confirmadas por el médico.

Los resultados a documentar, mediante la verificación y apoyo de un profesional médico son:

1. Número de niños con infecciones gastrointestinales, definido como diarrea con 3 o más deposiciones sueltas o acuosas dentro de las 24 horas con o sin vómitos.

2. Número de niños con infecciones del tracto respiratorio y las infecciones del tracto respiratorio inferior.
3. Número de niños con episodios de vómitos.
4. Número de niños con episodios de diarrea.
5. Número de infecciones gastrointestinales que duran más de 2 días.
6. Número de niños con tracto respiratorio superior infección, incluyendo rinitis, faringitis, sinusitis, otitis y resfriado común.
7. Número de niños con tracto respiratorio inferior infecciones, incluyendo neumonía, bronquitis y bronquiolitis.
8. Número de infecciones del tracto respiratorio que duran más de 3 días.
9. Número total de días con síntomas respiratorios y gastrointestinales
10. Número de días ausentes de la guardería debido a las infecciones.

Ésta es una propuesta preliminar y generalista, para llevar a cabo un estudio de intervención que requiere una planificación detallada y cuidadosa, así como la participación de numerosos profesionales de diferentes ámbitos.

6.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. La evidencia científica documentada sistemáticamente a través de las últimas 3 décadas indica que el *L. rhamnosus* GG (LGG®) es una cepa probiótica capaz de utilizar múltiples y complejos mecanismos de acción para reducir la incidencia de diarrea aguda infecciosa, diarrea asociada a antibióticos, o infecciones del tracto respiratorio superior, por lo tanto es una opción confiable y robusta para desarrollar leches fermentadas, como el yogurt, que prevengan este tipo de infecciones o disminuyan su duración en niños y niñas en edad escolar en Centroamérica.
2. La presencia de pili como adhesina intestinal en *L. rhamnosus* GG explicaría su excepcional capacidad de adhesión a la mucosa intestinal.
3. *L. rhamnosus* GG es una cepa robusta y ha mostrado en estudios clínicos la capacidad de sobrevivir al ácido y la bilis. En cuanto al proceso de producción de un alimento, muestra la capacidad de supervivencia y garantía de recuentos altos a pesar de las condiciones agresivas de estrés mecánico de operaciones rutinarias como la agitación, el bombeo, o presión positiva al momento del empaque del producto terminado.
4. En relación con la formulación de un yogurt con la cepa probiótica, se recomienda incorporar en la información del producto la relativa a la cepa, recuentos y una descripción precisa del efecto fisiológico de la cepa probiótica según describe la guía de probióticos y prebióticos de la Organización Mundial de Gastroenterología.
5. Para efectos de reducción de costo de la fórmula propuesta se recomienda evaluar la reformulación utilizando suero dulce (subproducto de producción de quesos frescos común en la región) como una alternativa para mantener el contenido de proteína en 2,7% y buscar una fórmula más accesible y costo efectiva a los consumidores.
6. El uso de bolsas de empaque, en lugar de empaques tradicionales de polietileno tereftalato (PET), puede ser tomado en consideración, basados en la experiencia positiva de uso de estos empaques en yogurts de bajo costo en proyectos sociales en África y productos comercializados por la industria para poblaciones desfavorecidas en Colombia, Honduras y El Salvador.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
2. Bortz G., Thomas H. (2017) Biotechnologies for inclusive development: scaling up, knowledge intensity and empowerment (the case of the probiotic yoghurt 'Yogurito' in Argentina). *Innov. Develop.* 7(1):37–61
3. Colodner, R., Edelstein, H., Chazan, B., & Raz, R. (2003). Vaginal colonization by orally administered *Lactobacillus rhamnosus* GG. ***The Israel Medical Association Journal***, 5(11), 767–769.
4. Consejo de Ministros de Integración Económica Centroamericana. (2011). Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.60:10 Etiquetado Nutricional Productos Alimenticios Preenvasados para Consumo Humano para la Población a partir de 3 años. La Gaceta N89. Costa Rica, 27-28.
5. Chr Hansen A/B. (2021). Method for enumeration of *Lactobacillus rhamnosus*, LGG® in fermented milk products- Guideline. Technical Bulletin, Denmark, 1-4.
6. De Simone, C. (2019). The Unregulated Probiotic Market. ***Clinical Gastroenterology and Hepatology***, 17(5), 809–817. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.01.018>
7. Douillard, F. P., Ribbera, A., Kant, R., Pietilä, T. E., Järvinen, H. M., Messing, M., Randazzo, C. L., Paulin, L., Laine, P., Ritari, J., Caggia, C., Lähteinen, T., Brouns, S. J., Satokari, R., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A., & de Vos, W. M. (2013). Comparative genomic and functional analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* strains and their comparison with strain GG. ***PLoS Genetics***, 9(8), e1003683. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003683>
8. Florez, I. D., Veroniki, A. A., Al Khalifah, R., Yepes-Nuñez, J. J., Sierra, J. M., Vernooij, R., Acosta-Reyes, J., Granados, C. M., Pérez-Gaxiola, G., Cuello-Garcia, C., Zea, A. M., Zhang, Y., Foroutan, N., Guyatt, G. H., & Thabane, L. (2018). Comparative effectiveness and safety of interventions for acute diarrhea and gastroenteritis in children: A systematic review and network meta-analysis. ***PLoS one***, 13(12), e0207701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207701>
9. Gomes, A.C., Bueno, A.A., de Souza, R. G., & Mota, J. F. (2014). Gut microbiota, probiotics and diabetes. ***Nutrition Journal***, 13, 60. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-60>
10. Gomes, A.C., Senaka, C., Nazzaro, F. (2021). Probiotics and Prebiotics in Foods: Challenges, Innovations, and Advances. Academic Press.
11. Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., & Salminen, S. (1992). Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. ***Digestive Diseases and Sciences***, 37(1), 121–128. <https://doi.org/10.1007/BF01308354>
12. Guarner, F. et al. World Gastroenterology Organization (2017). World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics. (www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html).
13. Gueimonde, M., Sakata, S., Kalliomäki, M., Isolauri, E., Benno, Y., & Salminen, S. (2006). Effect of maternal consumption of *Lactobacillus* GG on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates. ***Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition***, 42(2), 166–170. <https://doi.org/10.1097/01.mpg.0000189346.25172.fd>
14. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International

- Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **11**(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
15. Hojsak, I., Fabiano, V., Pop, T. L., Goulet, O., Zuccotti, G. V., Çokuğraş, F. C., Pettoello-Mantovani, M., & Kolaček, S. (2018). Guidance on the use of probiotics in clinical practice in children with selected clinical conditions and in specific vulnerable groups. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway : 1992), **107**(6), 927–937. <https://doi.org/10.1111/apa.14270>
 16. Hojsak, I., Snovak, N., Abdović, S., Szajewska, H., Misak, Z., & Kolacek, S. (2010). *Lactobacillus* GG in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical Nutrition* (Edinburgh, Scotland), **29**(3), 312–316. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.09.008>
 17. Horvath, A., Dziechciarz, P., & Szajewska, H. (2011). Meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for abdominal pain-related functional gastrointestinal disorders in childhood. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, **33**(12), 1302–1310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04665.x>
 18. Hungin, A., Mitchell, C. R., Whorwell, P., Mulligan, C., Cole, O., Agréus, L., Fracasso, P., Lionis, C., Mendive, J., Philippart de Foy, J. M., Seifert, B., Wensaas, K. A., Winchester, C., de Wit, N., & European Society for Primary Care Gastroenterology (2018). Systematic review: probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms - an updated evidence-based international consensus. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **47**(8), 1054–1070. <https://doi.org/10.1111/apt.14539>
 19. INCAP. (2020). Recomendaciones para la alimentación saludable durante COVID-19. Guatemala.
 20. Kim, S. K., Guevarra, R. B., Kim, Y. T., Kwon, J., Kim, H., Cho, J. H., Kim, H. B., & Lee, J. H. (2019). Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. *Journal of Microbiology and iotechnology*, **29**(9), 1335–1340. <https://doi.org/10.4014/jmb.1906.06064>
 21. Kort, R., Westerik, N., Mariela Serrano, L., Douillard, F. P., Gottstein, W., Mukisa, I. M., Tuijn, C. J., Basten, L., Hafkamp, B., Meijer, W. C., Teusink, B., de Vos, W. M., Reid, G., & Sybesma, W. (2015). A novel consortium of *Lactobacillus rhamnosus* and *Streptococcus thermophilus* for increased access to functional fermented foods. *Microbial Cell Factories*, **14**, 195. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0370-x>
 22. Laursen, R. P., & Hojsak, I. (2018). Probiotics for respiratory tract infections in children attending day care centers—a systematic review. *European journal of pediatrics*, **177**(7), 979–994. <https://doi.org/10.1007/s00431-018-3167-1>
 23. Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H. L., Verhoeven, T. L., Marien, E., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A., Vos, W. M., Keersmaecker, S. C., & Vanderleyden, J. (2012). Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(1), 185–193. <https://doi.org/10.1128/AEM.06192-11>
 24. McFarland L. V. (2015). Deciphering meta-analytic results: a mini-review of probiotics for the prevention of paediatric antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* infections. *Beneficial microbes*, **6**(2), 189–194. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0034>
 25. **RTCR**: Ministerio de Economía industria y comercio MEIC (2013). Reglamento Técnico RTCR 414:2008 Yogurt para Consumo Directo. Sistema Costarricense de información jurídica. <http://www.pgrweb.go.cr/scij/>
 26. Oberhelman, R. A., Gilman, R. H., Sheen, P., Taylor, D. N., Black, R. E., Cabrera, L., Lescano, A. G., Meza, R., & Madico, G. (1999). A placebo-controlled trial o *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in

- undernourished Peruvian children. *The Journal of Pediatrics*, **134**(1), 15–20. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(99\)70366-5](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(99)70366-5)
27. O'Connell Motherway, M., Zomer, A., Leahy, S. C., Reunanen, J., Bottacini, F., Claesson, M. J., O'Brien, F., Flynn, K., Casey, P. G., Munoz, J. A., Kearney, B., Houston, A. M., O'Mahony, C., Higgins, D. G., Shanahan, F., Palva, A., de Vos, W. M., Fitzgerald, G. F., Ventura, M., O'Toole, P. W., ... van Sinderen, D. (2011). Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(27), 11217–11222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105380108>
 28. Reunanen, J., von Ossowski, I., Hendrickx, A. P., Palva, A., & de Vos, W. M. (2012). Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(7), 2337–2344. <https://doi.org/10.1128/AEM.07047-11>
 29. Rougé, C., Piloquet, H., Butel, M. J., Berger, B., Rochat, F., Ferraris, L., Des Robert, C., Legrand, A., de la Cochetière, M. F., N'Guyen, J. M., Vodovar, M., Voyer, M., Darmaun, D., & Rozé, J. C. (2009). Oral supplementation with probiotics in very-low-birth-weight preterm infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **89**(6), 1828–1835. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26919>
 30. Ruas-Madiedo, P. (2021). Monodosis con probióticos para paliar la desnutrición infantil en poblaciones desfavorecidas. *The Conversation*. Recuperado October 11 de 2021, de <https://theconversation.com/masaonodosis-con-probioticos-para-paliar-la-desnutricion-infantil-en-poblaciones-desfavorecidas-162007>
 31. Secondulfo, M., Iafusco, D., Carratù, R., deMagistris, L., Sapone, A., Generoso, M., Mezzogiomo, A., Sasso, F. C., Carteni, M., De Rosa, R., Prisco, F., & Esposito, V. (2004). Ultrastructural mucosal alterations and increased intestinal permeability in non-celiac, type I diabetic patients. *Digestive and Liver Disease*, **36**(1), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2003.09.016>
 32. Siedler, S., Balti, R., & Neves, A. R. (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current opinion in biotechnology*, **56**, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.015>
 33. Segers, M. E., & Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions. *Microbial Cell Factories*, **13** Suppl 1(Suppl 1), S7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7>
 34. Sepp E, Mikelsaar M, Salminen S. (1993). Effect of Administration of *Lactobacillus casei* Strain Gg on the Gastrointestinal Microbiota of Newborns. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **6**, 309-314.
 35. Siedler, S., Rau, M. H., Bidstrup, S., Vento, J. M., Aunsbjerg, S. D., Bosma, E. F., McNair, L. M., Beisel, C. L., & Neves, A. R. (2020). Competitive Exclusion Is a Major Bioprotective Mechanism of Lactobacilli against Fungal Spoilage in Fermented Milk Products. *Applied and Environmental Microbiology*, **86**(7), e02312-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02312-19>
 36. Szajewska, H., & Hojsak, I. (2020). Health benefits of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* BB-12 in children. *Postgraduate Medicine*, **132**(5), 441–451. <https://doi.org/10.1080/00325481.2020.1731214>
 37. Szajewska, H., & Kołodziej, M. (2015). Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children and adults. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, **42**(10), 1149–1157. <https://doi.org/10.1111/apt.13404>

38. Szajewska, H., Kołodziej, M., Gieruszczak-Białek, D., Skórka, A., Ruszczyński, M., & Shamir, R. (2019). Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for treating acute gastroenteritis in children - a 2019 update. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 49(11), 1376–1384. <https://doi.org/10.1111/apt.15267>
39. Szajewska, H., Wanke, M., & Patro, B. (2011). Meta-analysis: the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhoea in children. ***Alimentary Pharmacology & Therapeutics***, 34(9), 1079–1087. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04837>
40. The Yoba for Life foundation. (2015). <http://www.yoba4life.com>. Acceso el 10 de octubre del 2021.
41. Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C., & Salminen, S. J. (1999). The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. ***FEMS Immunology and Medical Microbiology***, 26(2), 137–142. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01381.x>
42. Villena J., Salva S., Núñez M. (2012) Probiotics for everyone! The novel immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 and the beginning of social probiotic pro-grams in Argentina. ***International Journal of Biotechnology for Wellness Industries***, 1, 189–198.
43. Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 70(4), 2782–2858.

