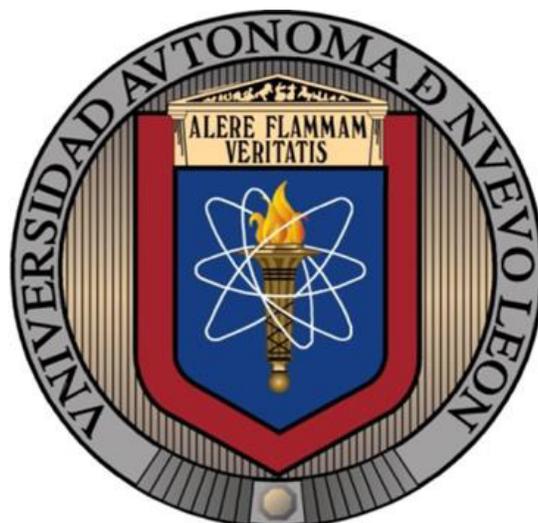


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

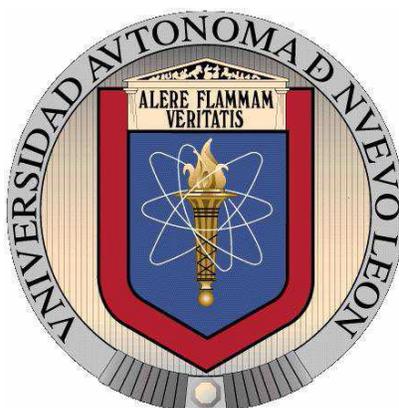
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FACTORES EXTRACELULARES DE
Lactobacillus casei, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* Y
Bifidobacterium longum SOBRE LA LÍNEA CELULAR HT-29 DE CÁNCER DE
COLON HUMANO

POR
PRISCILA MENDOZA FLORES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

ENERO 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TESIS

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FACTORES EXTRACELULARES DE
Lactobacillus casei, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* Y
Bifidobacterium longum SOBRE LA LÍNEA CELULARE HT-29 DE CÁNCER DE
COLON HUMANO

POR
PRISCILA MENDOZA FLORES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

ENERO 2014

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FACTORES EXTRACELULARES DE *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* Y *Bifidobacterium longum*
SOBRE LA LÍNEA CELULARE HT-29 DE CÁNCER DE COLON HUMANO

POR:

PRISCILA MENDOZA FLORES

COMISIÓN DE TESIS

Dra. María Porfiria Barrón González
Director

Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta
Secretario

Dra. María Eufemia Morales Rubio
Vocal 1

Dra. Ricardo Gómez Flores
Vocal 2

Dra. Patricia Támez Guerra
Vocal 3

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, la oportunidad y el poder para seguir estudiando y haber hecho este trabajo.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber permitido realizar la Maestría en Ciencias con acentuación en Microbiología.

Agradezco a la Doctora María Porfiria Barrón González por haberme permitido trabajar en el laboratorio de Biología Celular, realizar este proyecto de tesis de maestría utilizando los equipos, reactivos y cepas; asimismo, la ayuda, confianza y asesoría.

Agradezco a los Doctores Patricia Taméz Guerra y Ricardo Gómez Flores por haberme permitido trabajar en el laboratorio de Inmunología y Virología, utilizar los equipos y reactivos, y la confianza para realizar esta tesis de maestría.

Agradezco a la Bióloga Enriqueta Monreal (Queta) por darme asesoría para realizar los experimentos y la ayuda proporcionada con las dudas que se me presentaban en el trabajo.

Agradezco a mis amigos de la facultad; gracias por haber compartido conmigo momentos gratos y difíciles. A mis primos y mis mejores amigos también les doy gracias por alentarme, brindarme apoyo y paciencia....Mis logros son sus logros...

Agradezco a mis padres el Ing. José Mendoza Scott y Rosalinda Flores Tristán por el apoyo que siempre me han dado, el educarme que siempre es posible salir adelante no importando las barreras que se atravesasen.

DEDICATORIA

A Dios y a la vida, esto es la prueba de lo que puedo lograr y ofrecer mi investigación para el bien de la humanidad.

A mis padres, esta es la recompensa de todo lo que me han dado para salir adelante.

A mis tíos y primos que siempre me han brindado apoyo y cariño.

A todas las personas que son muy especiales en mi vida que desde hace años están conmigo y me apoyan en las decisiones que tomo.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
Agradecimientos	i
Dedicatoria	ii
Lista de tablas	v
Lista de figuras	vi
Nomenclatura	vii
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1 Probióticos	5
2.1.1 Bacterias lácticas	10
2.1.2 <i>Lactobacillus sp.</i>	11
2.1.3 Bifidobacterias	14
2.2 Tracto digestivo	15
2.3 Microbiota del tracto digestivo	17
2.4 Importancia de los probióticos en la flora gastrointestinal	22
2.5 Cáncer	25
2.5.1 Tratamiento para cáncer de colon y recto	34
2.6 Estrategias terapéuticas	36
3. Hipótesis	39
4. Objetivos	40
4.1 Objetivo General	40
4.2 Objetivos Específicos	40
5. Material y método	41
5.1 Material biológico	41
5.2 Preparaciones de soluciones y medios de cultivo	41

5.3 Probióticos	41
5.3.1 Preparación de medio de cultivo	41
5.3.2 Mantenimiento	41
5.4 Cinética de crecimiento	42
5.4.1 Método turbidimétrico	42
5.4.2 Método de recuento bacteriano en placa (RBP)	42
5.5 Obtención de factores extracelulares (FE) de probióticos	42
5.6 Obtención del liofilizado de los FE de probióticos	43
5.7 Línea celular	43
5.7.1 Mantenimiento <i>in vitro</i>	43
5.7.2 Congelación de la línea celular	43
5.8 Valoración de actividad biológica	44
5.8.1 Valoración citotóxica de leucocitos	47
5.9 Análisis estadístico	47
6. Resultados	48
6.1 Cinética de crecimiento	48
6.2 Unidades formadoras de colonias (UFC)	49
6.3 Liofilizados de factores extracelulares (LFE)	50
6.4 Actividad biológica de los FE sobre HT-29	51
6.4.1 Dosis letal media	56
6.5 Prueba de citotoxicidad	56
7. Discusiones	59
8. Conclusiones	67
9. Perspectivas	68
10. Literatura citada	69
Anexo I	86
Anexo II	87

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Microorganismos probióticos	13
2. Características de la microbiota del tracto intestinal	24
3. Características de los FE liofilizados de las cepas probióticas	50
4. Determinación de la interferencia microbiana de los LFE sobre HT-29	52
5. Actividad biológica	53
6. DL ₅₀ de los LFE frente a la línea celular HT-29	56

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Efectos benéficos atribuidos a los microorganismos probióticos y sus posibles mecanismos.	10
2. Cambios en la microbiota intestinal con la edad.	15
3. Esquema de organización histológica en el intestino delgado.	16
4. Cambios en la microbiota intestinal en infantes desde recién nacidos hasta 7 días de edad.	18
5. Microbiota del tracto digestivo.	19
6. Concentración de microorganismos del tracto gastrointestinal.	20
7. Defensa inmune contra la bacteria comensal del intestino.	21
8. Mecanismos directos de acción antitumoral atribuidos a microorganismos probióticos.	28
9. Interferencia entre bacterias adheridas a las células epiteliales del intestino. La actividad de los probióticos es por la secreción de ácidos orgánicos, surfactantes y agentes antimicrobianos.	33
10. Diseño experimental de la actividad biológica.	45
11. Método del MTT.	46
12. Gráfica de la cinética de crecimiento de bacterias probióticas.	49
13. Resultado de las UFC de bacterias probióticas.	50
14. Los LFE de las cepas probióticas	51
15. Actividad biológica de los LFE frente la HT-29	54
16. Imágenes del bioensayo de los LFE y su grupo control positivo y negativo contra HT-29.	55
17. Efecto de FE de <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> y <i>B. longum</i> sobre la proliferación <i>in vitro</i> de células mononucleares de la de sangre periférica humana.	58

NOMENCLATURA

®	marca registrada
°C	grados Celsius
ANOVA	análisis de varianza
AOM	azoxymetano
CA	cripta aberrante
CO ₂	dióxido de carbono
ConA	Concavalina A
CRC	cáncer colorrectal
<i>et al</i>	colaboradores
FAO	Organización para la Alimentación y Agricultura
FCA	formación de cripta aberrante
FE	factores extracelulares
G	gramos
H	horas
K ⁺	potasio
K ₂ HPO ₄	difosfato de potasio
KH ₂ PO ₄	fosfato de potasio monobásico
Lb	libra
LFE	liofilizados de factores extracelulares
mg/mL	miligramos sobre mililitro
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
N	normalidad
Na ⁺	sodio
NaCl	cloruro de sodio
nm	nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de iones hidrógeno

RBP	Recuento bacteriano en placa
Rpm	revoluciones por minuto
SCFA	ácidos grasos de cadena corta
UFC	unidades formadoras de colonias
λ	longitud de onda
μL	microlitros
μm	micrometros

RESUMEN

Los probióticos (bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) son organismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas ejercen un efecto benéfico para la salud del huésped. Diversos trabajos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los probióticos detoxifican y tienen propiedades antimutagénicas, demostrando un efecto benéfico en cáncer colorrectal, el cuarto a nivel mundial en defunciones por cáncer. En algunos trabajos *in vitro* se ha observado que los factores extracelulares bacterianos presentan actividad biológica sobre protozoarios y bacterias de importancia médica, es por esto que en este trabajo se obtuvieron los liofilizados de factores extracelulares (LFE) de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum* y se determinó la actividad biológica sobre la línea tumoral de colon HT-29. Se inocularon estas cuatro cepas en un litro de medio caldo MPT a 37°C durante 24 h. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 20 min, se esterilizó con filtros Millipore de 0.22µm y así se obtuvieron los factores extracelulares; se liofilizaron y se preparó la solución madre y diluciones de cada cepa probiótica. Se utilizaron ocho concentraciones diferentes (430, 215, 107, 53, 26, 13, 7 y 3.5mg/mL) de los LFE. Se utilizó como control negativo de proliferación el compuesto químico doxorrubicina HCl. La actividad citotóxica demostró una tendencia dosis/respuesta y la última concentración obtuvo diferencia significativa ($p=0.05$). De las cepas *L. casei*, *L. plantarum*, y *B. longum* los LFE no tuvieron diferencia significativa entre ellas, las últimas dos diluciones de éstas si tuvieron diferencia estadística. Los LFE tuvieron diferencia significativa comparada contra el control químico, hubo un mayor efecto citotóxico, donde la inhibición del crecimiento de la línea celular HT-29 fue marcada (*L. casei* 62.7%, *L. plantarum* 61.5%, *L. acidophilus* 68.5% y *B. longum* 61.2% de inhibición de crecimiento). Los resultados nos permiten concluir que los LFE tienen actividad citotóxica contra la línea celular HT-29 de cáncer de colon humano, así como poseen potencial de agente preventivo.

ABSTRACT

Probiotics (bacteria of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*) are living organisms which when administered in adequate amounts exert a beneficial effect on host health. Several studies *in vivo* and *in vitro* have shown that probiotics are detoxified and antimutagenic properties, demonstrating a beneficial effect on colorectal cancer, the fourth worldwide in cancer deaths. Some studies *in vitro* have shown that bacterial extracellular factors have biological activity on protozoa and bacteria of medical importance, which is why in this work were obtained extracellular factors lyophilized (LFE) of *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* and *Bifidobacterium longum* and determined the biological activity on the colon tumor cell line HT-29. These four strains were inoculated in one liter of broth medium MPT at 37°C for 24 h. Then centrifuged at 2500 rpm for 20 min, sterilized with 0.22µm Millipore filters were obtained and thus extracellular factors, lyophilized, and the solution was prepared and dilutions of each probiotic strain. Used eight different concentrations (430, 215, 107, 53, 26, 13, 7 and 3.5mg/mL) of the LFE. Was used as a negative control proliferation chemical compound doxorubicin HCl. Cytotoxic activity showed a tendency dose/response and the last concentration obtained significant difference ($p=0.05$). Strains *L. casei*, *L. plantarum* and *B. longum* the LFE had no significant difference between them the last two dilutions of these if they had statistical difference. The LFE had significant difference compared to control chemical, there was a greater cytotoxic effect, where the growth inhibition of HT-29 cell line was marked (*L. casei* 62.7 %, *L. plantarum* 61.5 %, *L. acidophilus* 68.5% and *B. longum* 61.2 % inhibition of growth). The results allow us to conclude that the LFE have cytotoxic activity against cell line HT- 29 human colon cancer and have potential preventive agent.

1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud al huésped” (FAO/OMS, 2002). Como microorganismos probióticos se utilizan principalmente las bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque no exclusivamente.

Varios trabajos han demostrado que los probióticos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo, son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolifáticos y se utilizan para prevenir infecciones entéricas y gastrointestinales, así como también se ha reportado propiedades antimutagénicas y efecto benéfico en tratamiento de cáncer colorrectal en modelo murino (Fotiadis *et al.*, 2008; Wollowski *et al.*, 2001; Gupta y Garg, 2009; Patel y Patel, 2010).

Por otra parte, el cáncer de colon y recto puede aparecer en cualquier persona (sobre todo a partir de los 40 años), pero es más frecuente a partir de los 60 años (Jemal *et al.*, 2002). En el mundo el cáncer colorrectal ocupa el cuarto lugar con 608 000 defunciones (OMS, 2008). Se sabe que en el caso del cáncer de colon y de recto el principal factor involucrado es la dieta (Forman *et al.*, 2004; Armstrong y Doll, 1975; Willet, 2001).

El cáncer habitualmente comienza con la formación de un pólipo benigno o adenoma (una especie de verruga que sale por dentro del intestino). Con el tiempo, se transforma y va invadiendo las distintas capas que componen la pared del colon y el recto. Una vez que aparece esta situación, el cáncer se puede extenderse y puede producir metástasis. Se ha reportado el efectos de los probióticos sobre patologías en humanos, tales como en carcinogénesis, mutagénesis y tumores ya que los probióticos actúan en la absorción del mutágeno, estimulación del sistema inmunitario, inhibición de la producción carcinógena de la microflora intestinal (Lopez Brea y Domingo, 2007).

Se ha demostrado que la ingesta de probióticos aumenta la concentración de bacterias benéficas para la salud (lactobacilos y bifidobacterias) en las heces y reduce la de bacterias nocivas (clostridios y enterococos) (Guerin *et al*, 1998). También se ha demostrado que algunas cepas de probióticos reducen la actividad de las enzimas procancerígenas que sintetiza la microflora intestinal (Screefumar y Hosono, 2000).

Sin embargo, existen múltiples reportes en donde quedan de manifiesto, los efectos negativos que los probióticos pueden ocasionar en personas inmunodeprimidas, algunas cepas de lactobacilos han sido relacionadas con efectos perjudiciales, como por ejemplo raros casos de bacteriemia (Saxelin *et al.*, 1996), endocarditis (Mackay *et al*, 1999) y bsceso hepático en pacientes diabéticos (Rautio *et al*, 1999).

No obstante, los casos de asociación entre infecciones sistémicas y el consumo de probióticos es muy raro, y todos se han producido en pacientes inmunodeprimidos que estaban sometidos a tratamiento médico (FAO/OMS, 2001).

En trabajos recientes, se ha reportado la actividad inhibitoria de los factores extracelulares de varios probióticos sobre cultivos axénicos *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS (Barrón *et al.*, 2008), *Giardia lamblia* (Calderón, 2011; Ontiveros, 2011) y *Trichomonas vaginalis* (Ontiveros, 2011), así como en las bacterias *Salmonella sp*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocitógenes*, *Serratia marscecens* (García, 2011). Estos resultados brindan la posibilidad de realizar experimentos empleando únicamente los metabolitos producto de los probióticos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Probióticos

En 1857 Louis Pasteur descubrió las bacterias lácticas; en 1878, Lister reportó el aislamiento de bacterias a partir de leche ácida; en 1889, Henry Tissier descubrió especies de *Bifidobacterium*, y en 1900 *Lactobacillus acidophilus* fue descubierto por Moro. En 1908, Elie Metchnikoff, científico ruso que recibió el Premio Nóbel, observó que en Bulgaria un número increíble de personas vivían más de 100 años; este hecho lo relacionó con el gran consumo de bacterias en las leches fermentadas como una forma de modular la flora intestinal y así evitar enfermedades y alargar la vida de la gente. En 1908 por sus estudios en inmunidad celular, descubrió cualidades beneficiosas para la salud en la fermentación de la leche. Él observó que los lactobacilos transformaban la lactosa en ácido láctico, y que dicha acidez confería un ambiente hostil para las bacterias patógenas (Mennickent y Green, 2009; Figueroa *et al.*, 2006).

La aplicación terapéutica de los probióticos fuera del ámbito de las leches fermentadas fue instituida en 1906 por Tissier, quien utilizó cepas de *Bifidobacterium bifidum* aisladas tiempo atrás por él mismo (1899-1900) para aliviar infantes de diarrea (García-Garibay, 1996).

En 1930, Minoru Shirota aisló de heces humanas una cepa de *Lactobacillus casei*, que posteriormente cultivó en leche, originando una bebida con características probióticas.

Shirota atribuyó a este lactobacilo la capacidad de promover la salud intestinal y prevenir enfermedades mediante su consumo oral y en 1935 desarrolló el Yakult, siendo este producto la primera leche fermentada diseñada específicamente como probiótico. Shirota fue uno de los pioneros en el estudio de probióticos, aunque las bases científicas más sólidas de los verdaderos beneficios de estas bacterias en la

salud se han empezado a estudiar con mayor rigor científico desde mediados de la década de 1980 (Figueroa *et al.*, 2006).

La palabra probiótico fue inicialmente usada como un antónimo de la palabra “antibiótico”. Esta deriva de las palabras griegas $\pi\rho\omicron$ y $\beta\iota\omicron\tau\omicron\varsigma$ traducido como “por la vida” (Hamilton-Miller y col., 2003).

Vasilijevic 2008, refiere la historia del concepto, enunciado que el primero en utilizar esta palabra fue Kollan 1952, para describir la recuperación de la salud de pacientes malnutridos empleando suplementos orgánicos e inorgánicos y que un año después Vergin propuso, que el desbalance en el cuerpo debido al tratamiento con antibióticos. Posteriormente en 1955 Kolb reconoció los efectos detrimentales de la terapia con antibióticos y propuso utilizar a los probióticos como preventivo.

Lilly y Stillwell 1965 definieron los probióticos como sustancias producidas por un microorganismo que promueve el crecimiento de otros organismos. Sperti en 1971 y Fujji y Cook 1973 describieron a los probióticos como componentes que pueden estimular el crecimiento microbiano o mejorar la respuesta inmune del hospedero sin inhibir el crecimiento de un cultivo *in vitro*. Paker 1974 los definió como organismos y sustancias las cuales contribuyen al balance microbiano del intestino. Esta definición fue criticada por muchos autores debido a que al decir “sustancias”, pueden quedar incluidos los antibióticos (Vasilijevic, 2008).

Fuller 1992 definió “suplemento alimenticio de microorganismos vivos, los cuales afectan benéficamente al animal hospedero por el mejoramiento de su balance microbiano intestinal”. En 1999 Salminen y colaboradores ofrecieron su definición incorporando bacterias no viables en la misma (Holzapfel *et al.*, 1998).

Los probióticos son organismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso para el hospedador, precisando que ese

beneficio puede ser fisiológico (Reid *et al.*, 2003) o para la salud (FAO/OMS, 2001).

Las diversas definiciones propuestas para el término “probiótico” configuran características que debe reunir una cepa microbiana para ser incluida en dicho término. A continuación se enumeran requisitos con aportaciones de diversos autores (Salminen *et al.*, 1996; 2005; Dunne *et al.*, 1999; Casas y Dobrogosz, 2000; Reid *et al.*, 2003):

- a) Identificación de la cepa: se considera imprescindible una correcta identificación de la cepa utilizando para ello técnicas fenotípicas y genotípicas.
- b) Origen humano: las cepas aisladas de seres humanos sanos probablemente carecen de patogenicidad y presentan mayor facilidad para colonizar el intestino humano. Sin embargo se utilizan como probióticos cepas de otros orígenes.
- c) Bioseguridad: la ausencia de patogenicidad, debe investigarse la ausencia de producción de toxinas, de actividad hemolítica y de infectividad en modelos exigentes como pueden ser animales experimentalmente inmunocomprometidos.
- d) Tolerancia a las condiciones ambientales del tracto intestinal: si los microorganismos probióticos deben llegar viables al intestino, es preciso que resistan el pH gástrico, las enzimas digestivas, y la acción de detergente e inhibidora de las sales biliares. Esta resistencia no tiene que entenderse en términos absolutos: la ingestión de inóculos con un alto número de microorganismos probióticos permite que una cantidad suficiente de ellos permanezca viable al llegar al intestino, aunque su número se haya reducido drásticamente por inactivación en el estómago.
- e) Adherencia al epitelio intestinal: aunque los probióticos se ingieren como microorganismos exógenos, idealmente debieran colonizar el intestino de forma persistente, para lo cual es necesario que posean la capacidad de adherirse a los enterocitos.

- f) Producción de antibiosis: la producción de sustancias antimicrobianas se considera uno de los mecanismos por los que los microorganismos probióticos suministran protección frente a los enteropatógenos. Esta antibiosis puede ser ejercida a través de mecanismos metabólicos generales como la producción de ácidos orgánicos o de radicales oxidantes o bien por la producción de antibióticos.
- g) Capacidad para actuar como interfaz metabólico: actuar como un escudo metabólico que impida la llegada de agentes nocivos a los enterocitos. Algunos microorganismos probióticos interfieren con la asimilación del colesterol, hidrolizan la lactosa, o inactivan agentes cancerígenos.
- h) Modificación de la respuesta biológica: varios de los efectos más importantes atribuidos a los probióticos se ejercen a través de su actividad inmunomoduladora: es el caso de la protección frente a infecciones intestinales o extraintestinales, la inhibición de tumores ya establecidos, efectos antiinflamatorios y antialérgicos. La inmunomodulación puede deberse a estructuras microbianas o a metabolitos bioactivos producidos incluso previamente a su ingestión (por ejemplo péptidos bioactivos procedentes de la digestión microbiana de proteínas lácteas). Esta característica no debe considerarse absoluta ya que es concebible que un microorganismo ejerza efectos probióticos por otras vías.
- i) Viabilidad de la fabricación a escala comercial de productos conteniendo la o las cepas probióticas: una cepa que no resista los procesos tecnológicos de producción o no mantenga su actividad en vehículos apropiados, no podrá tener aplicación como probiótico por excelentes que sean sus propiedades en los ensayos biológicos.

Hasta la fecha, la ingestión de cepas de probióticos no ha dado lugar a una colonización y supervivencia duraderas y mensurables en el huésped. Invariablemente, los microorganismos persisten días o semanas, pero no más tiempo (Tannock *et al.*, 2000). Por lo tanto, la utilización de probióticos confiere

probablemente efectos más transitorios que duraderos, por lo que parece ser necesaria una ingestión continuada.

Las bacterias probióticas pueden incrementar la resistencia contra los patógenos intestinales mediante mecanismos antimicrobianos. Estos incluyen la colonización competitiva y la producción de ácidos orgánicos, como los ácidos láctico y acético, bacteriocinas y otros metabolitos primarios como el peróxido de hidrógeno y el dióxido de carbono. La producción de ácidos orgánicos por las bacterias probióticas disminuye el pH intestinal y por lo tanto se inhibe el crecimiento de patógenos. Estos ácidos orgánicos incrementan los movimientos peristálticos, lo que de manera indirecta remueve los patógenos acelerando la velocidad con la que atraviesan el intestino. El peróxido de hidrógeno producido puede funcionar a través del sistema lactoperoxidasatiocianato, en el cual el peróxido de hidrógeno oxida el tiocianato para convertirlo en ácido hidrocianico que es perjudicial para los patógenos. El dióxido de carbono y el diacetil sintetizado por las bacterias ácido lácticas inhiben el crecimiento de patógenos. Numerosas bacteriocinas, como acidofilina, lactobacilina, acidolina, lactocidina y lactolina muestran acción antagónica contra los patógenos (Fig. 1) (Kailasapathy y Chin, 2000).

La interferencia microbiana es un fenómeno en el cual los microorganismos ya establecidos en un ecosistema previenen que colonicen otro tipo de microorganismos el mismo sitio. Ocurre en la naturaleza, en lo particular en ecosistemas asociados con cuerpos animales. La interferencia microbiana, también conocida como resistencia a la colonización, es la primera línea de defensa con infecciones por microorganismos patógenos que causan enfermedades. Es ejercida por la microbiota y es una resistencia importante no específica para el huésped.

Ha sido investigada en el tracto gastrointestinal; la evidencia de que es un importante mecanismo de resistencia es dada por tres tipos de estudio: sujetos tratados con antibióticos, animales gnotobióticos y animales bajo estrés (Tannock, 1995).

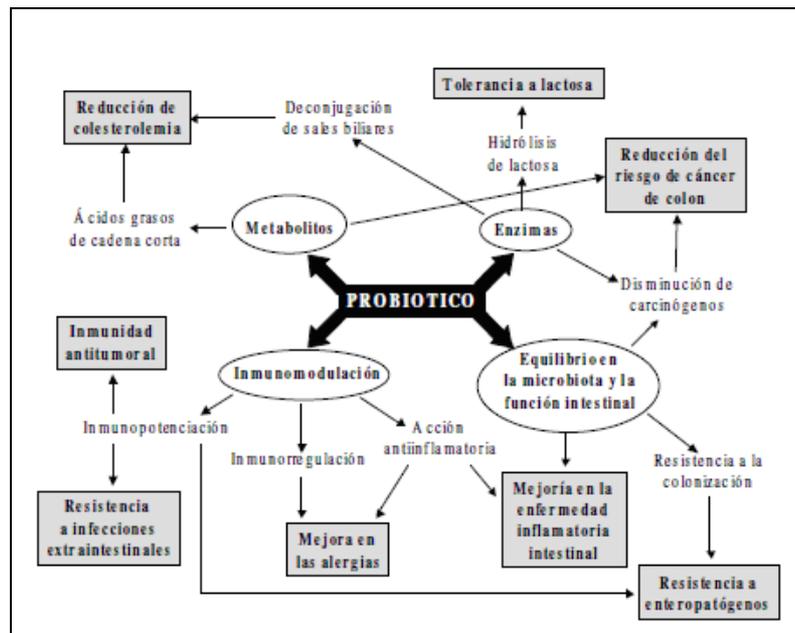


Fig. 1. Efectos beneficios atribuidos a los microorganismos probióticos y sus posibles mecanismos (tomado de Bujalance, 2006).

2.1.1 Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas son bacterias Gram positivas no esporuladas que tienen en común la capacidad de producir ácido láctico por fermentación utilizando azúcares como sustrato. Son microorganismos que requieren factores de crecimiento complejos como vitaminas del grupo B, purinas, pirimidinas y aminoácidos (García-Garibay, 1996). Dado que carecen de porfirinas y citocromos, no realizan fosforilación por transporte de electrones, reciben energía por fosforilación a nivel sustrato.

Producen energía únicamente por fermentación. Carecen de la capacidad de biosíntesis del grupo hemo, razón por la cual son catalasa negativa. Crecen en presencia o ausencia de O₂, por lo que algunas bacterias son anaerobias facultativas y otras obligadas. Forman colonias pequeñas nunca pigmentadas, asociadas a la ausencia de citocromos.

Las bacterias lácticas se distinguen por su tolerancia a la acidez, pueden seguir creciendo aún a valores de pH menores a 5.0. Se agrupan las especies de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* y *Pediococcus*.

2.1.2 *Lactobacillus sp.*

Un miembro característico del grupo de bacterias del ácido láctico es el género *Lactobacillus* (Beijerinck 1901). Los lactobacilos son bacilos o cocobacilos gram-positivos no esporulados, que, como miembros del *Phylum Firmicutes*, tienen un contenido en guanina-citocina inferior al 50%; aerotolerantes o anaerobios, su metabolismo es estrictamente fermentativo, distinguiéndose especies homofermentadoras (el ácido láctico supera el 85% de los productos de fermentación de glucosa) y heterofermentadores (producen ácido láctico, CO₂, etanol y/o ácido acético en proporciones equimoleculares), y sus complejos requerimientos nutritivos reflejan sus nichos ecológicos, ricos en carbohidratos: plantas y residuos vegetales, alimentos fermentados y como componentes de la microbiota de compartimentos del cuerpo de animales (especialmente el intestino) (Tannock, 2004).

En la actualidad se conocen 56 especies del género *Lactobacillus* distribuidas en varios nichos ecológicos como son el tracto gastrointestinal y el tracto genital y constituyen parte importante de la microflora endógena del humano. Su distribución se ve afectada por varios factores ambientales, los cuales incluyen pH, disponibilidad de oxígeno, nivel de sustratos específicos, presencia de secreciones e interacción bacteriana (Gomes y Malcata, 1999).

De gran importancia en la actualidad, el *Lactobacillus casei* Shirota es una bacteria ácido láctica que se encuentra en muchos productos: verduras fermentadas, carne y productos de leche fermentada. Además se encuentra en el tracto intestinal y genital de animales y humanos. *L. casei* Shirota es una bacteria anaerobia ácido tolerante con un metabolismo fermentativo estricto con el ácido

láctico en mayores cantidades como producto final, puede ser utilizada ampliamente en la industria por sus propiedades probióticas (Figueroa *et al.*, 2006).

Metchnikoff, sugirió que algunos de los síntomas del metabolismo gastrointestinal enfermo podrían neutralizarse a través de *L. casei* Shirota utilizando como medio el yogur (Saloff-Coste, 1997).

Algunos de los beneficios del *Lactobacillus casei* Shirota son fortalecer la flora intestinal; logrando mantenerla en equilibrio y con ello promover la regulación de los movimientos peristálticos (movimiento natural de los intestinos), ayudar a reducir las sustancias tóxicas producidas por las bacterias putrefactivas, incrementar el número de bacterias benéficas en los intestinos, disminuir los niveles altos de colesterol en sangre y estimular el sistema inmunológico (<http://www.yakult.com> accesado 4/oct/2013).

L. casei Shirota modula la flora intestinal, tiene efectos positivos en tratamientos contra el cáncer y disminución de la actividad enzimática en las heces fecales (Ouwehand *et al.*, 1999).

El *L. acidophilus* se encuentra de forma natural en el tracto gastrointestinal en humanos y en algunas leches que se fermentan de manera tradicional, tales como el kefir. Irónicamente, la mayoría de las cepas de *L. acidophilus* no sobreviven adecuadamente en la leche fermentada debido al pH bajo, y es difícil mantener un número grande de ellos en el producto. Por estas razones, los productos de leche fermentada que contienen esta bacteria frecuentemente se producen en forma separada y después se mezclan. Algunos ejemplos incluyen la adición de este microorganismo a los cultivos de yogur. Este microorganismo es considerado como probiótico debido a que su consumo en ciertas cantidades puede ejercer diversos beneficios sobre la salud y no sólo se encuentran limitados al mejoramiento del balance microbiano, sino que también tiene otros efectos,

tales como el alivio de la intolerancia a la lactosa o la modulación del sistema inmunitario (Salminen *et al*, 1998).

De otras bacterias menos conocidas como *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, y *Saccharomyces boulardii* se ha encontrado que tienen efectos sobre la salud (Tabla 1), tales como alivio o disminución de la intolerancia a la lactosa, estabilización de la microflora intestinal a través del mejoramiento en la adherencia de células a la mucosa intestinal o la reducción de la duración de la diarrea mediante la colonización del tracto intestinal (Saloff-Coste, 1997).

Tabla 1. Microorganismos probióticos

Género	Especie	Efecto clínico en humanos
<i>Lactobacillus</i>	<i>GG</i>	Adherencia a las células intestinales, estimulación de la respuesta inmune, prevención de la diarrea patogénica.
	<i>johnsonii</i>	Prevención de la diarrea del viajero, modulación de la flora intestinal, alivio de la intolerancia a la lactosa.
	<i>casei</i> <i>Shirota</i>	Modulación de la flora intestinal, efectos positivos en tratamientos contra el cáncer, disminución de la actividad enzimática en las heces fecales.
	<i>plantarum</i>	Adherencia a las células intestinales humanas, modulación de la flora intestinal.
	<i>acidophilus</i>	Inhibición de bacterias patógenas, adhesión a las células intestinales humanas.
	<i>reuteri</i>	Colonización del tracto gastrointestinal.
	<i>bulgaricus</i>	Reduce o elimina los síntomas de intolerancia a la lactosa.
<i>Bifidobacterium</i>	<i>bifidum</i>	Reduce la duración de la diarrea y aumenta la respuesta inmunológica de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena, <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ejerciendo un efecto antagonista o una actividad antimicrobiana (Mattila-Sandholm et al., 1999).
	<i>lactis</i>	Prevención de la diarrea del viajero, tratamiento contra la diarrea viral incluyendo rotavirus, modulación de la respuesta inmune.
	<i>longum</i>	Exclusión competitiva de <i>Escherichia coli</i> , inhibición de <i>E. coli</i> de la superficie de la mucosa intestinal humana.
<i>Saccharomyces boulardii</i>		Prevención de la diarrea causada por antibióticos, tratamiento contra la colitis causada por <i>Clostridium difficile colitis</i> .

Tomado de Ouwehand *et al.* (1999)

2.1.3 Bifidobacterias

Henry Tissier, un médico pediatra francés, observó que los niños con diarrea tenían una baja cantidad de bifidobacterias en sus heces. Estas bacterias, por el contrario, eran abundantes en los niños sanos. Tissier postuló que la administración de bifidobacterias a pacientes con diarrea podría ayudar a restaurar su flora intestinal (Mennickent y Green, 2009).

Las bifidobacterias forman parte de las bacterias anaerobias que se instalan en primer lugar en el intestino de los recién nacidos; factores exógenos como los oligosacáridos presentes en la leche materna contribuyen a la colonización intestinal por estas poblaciones bacterianas concretas (Moreau y Gaboriau, 2000). Las bifidobacterias son bacilos gram-positivos con alto contenido G + C, con una peculiar morfología bacilar que suele ramificarse en los extremos, anaerobios facultativas, catalasa negativa, no producen gas, no esporulados e inmóviles, que habitan en el tracto intestinal de animales y en aguas residuales (Prescott *et al.*, 2005; Sakata *et al.*, 2006, Chung *et al.*, 1999). El género *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, comprende 33 especies reconocidas (Euzéby, 2006), 10 de las cuales (*Bifidobacterium adolescentes*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. gallicum* y *B. dentium*) se han identificado como componentes de la microbiota intestinal humana (Kóová *et al.*, 2006).

Generalmente, las bifidobacterias se encuentran en cantidades superiores a 10^{10} por cada gramo de contenido intestinal y comprenden cerca del 25% de la microflora; sin embargo, la cantidad de bacterias va disminuyendo con la edad, estado de salud y dieta (Fig. 2) (Linder *et al.*, 2007).

Bifidobacterium longum predomina a nivel de colon transversa y descendente, e interviene en la producción de una gran cantidad de sustancias involucradas en el metabolismo del individuo.

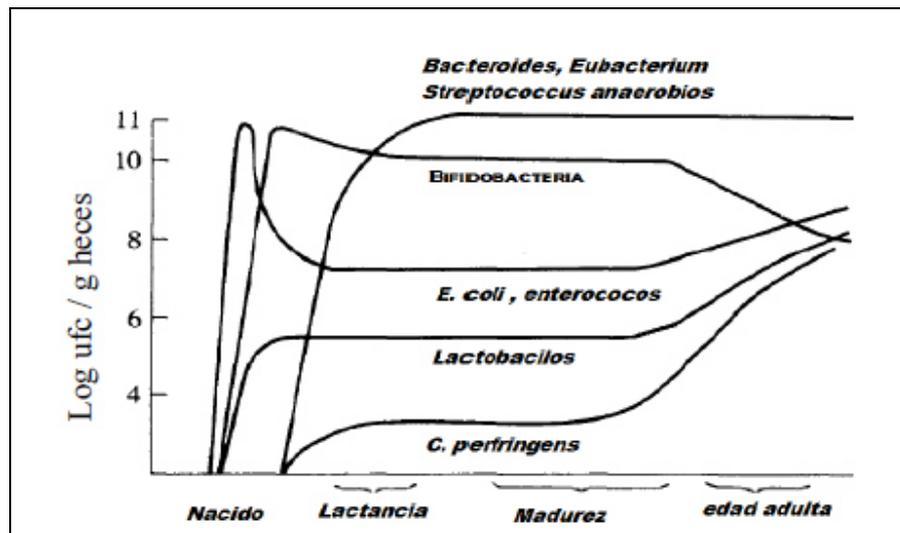


Fig. 2. Cambios en la microbiota intestinal con la edad (imagen tomada de Lourens-Hatlingh y Viljoen, 2001).

La mayoría de las cepas de bifidobacterias que son importantes para humanos, crecen a una temperatura óptima de 36-38°C; son ácido-tolerantes y el pH óptimo para su crecimiento se encuentra entre 6.5 y 7.0, las cepas que se mantienen en un pH superior a 8.5 no sobreviven (Biavati *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 1999).

2.2 Tracto digestivo

El tubo digestivo está formado por cavidad oral, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y ano. Su organización histológica general comprende, desde la luz del tubo, el epitelio mucosal, la *lámina propria*, la submucosa, una túnica muscular y una túnica adventicia (faringe, esófago y recto) o serosa. La mucosa digestiva, en especial la intestinal, constituye una frontera crítica entre un medio externo especial (espacio luminal) y el medio interno: a través de ella pasan nutrientes, electrolitos y agua, pero también pueden hacerlo toxinas de diverso origen y está en contacto con un enorme número de microorganismos (Turner, 2003).

La mucosa intestinal, que es la mayor superficie del cuerpo en contacto con un ambiente externo (200 a 300m²), está relacionada con células y tejidos inmunitarios, formando una línea defensiva que ofrece, a la vez, nichos ecológicos óptimos para numerosos microorganismos y eficaces mecanismos antimicrobianos: el resultado es un ecosistema complejo y dinámico (Fig. 3) (Liévin y Servin, 2006).

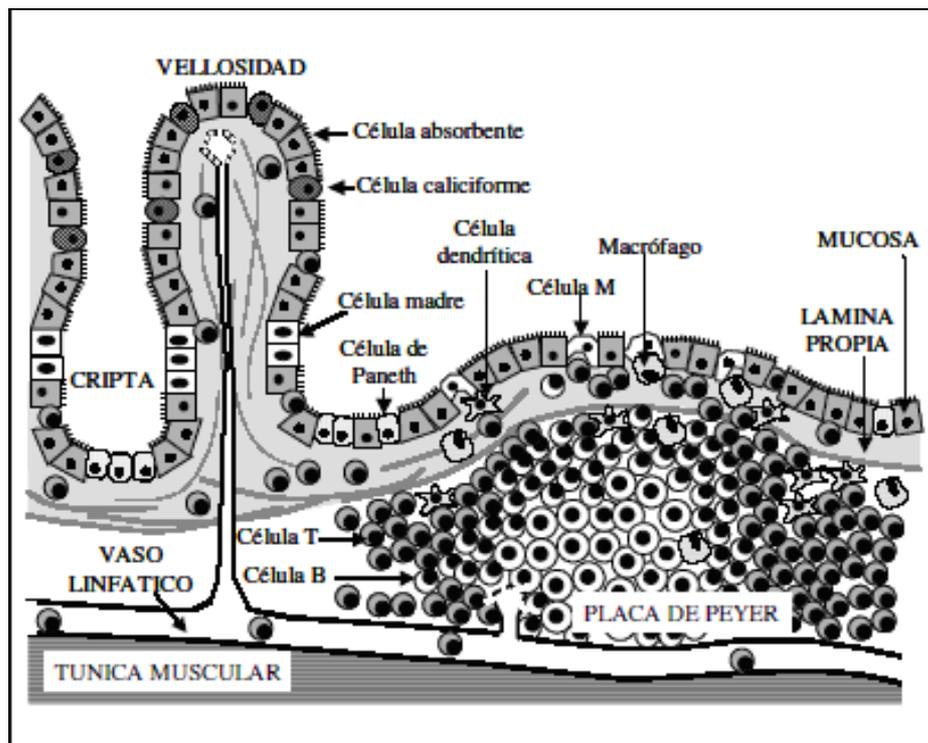


Fig. 3. Esquema de organización histológica en el intestino delgado (tomado de Bujalance 2006).

En una mucosa intestinal intacta, las uniones entre los enterocitos constituyen una excelente barrera que excluye el paso de macromoléculas y patógenos (Dotan y Mayer, 2003). Además, las células de Paneth, abundantes en el fondo de las criptas de Lieberkühn, protagonizan importantes funciones defensivas inespecíficas: en respuesta a estímulos diversos, ya sean productos bacterianos (lipopolisacárido, peptidoglicano y ácidos lipoteicoicos), neurotransmisores (acetilcolina) o citocinas producidas por linfocitos, producen una diversidad de agentes antimicrobianos (lisozima, defensinas, fosfolipasa A₂), citocinas proinflamatorias y estimuladoras

(tumor necrosis factor α o TNF- α , colony stimulating factor-1 o CSF-1, epithelial growth factor o EGF), enzimas y otras moléculas que participan en la defensa frente a microorganismos, la respuesta inflamatoria, el crecimiento de células epiteliales y otras funciones metabólicas (Keshav, 2004).

Finalmente, la mucosa intestinal está protegida por dos capas de glicoconjugados: unidas a la superficie celular, las glicoproteínas y glicolípidos del glicocálix; y, por encima de éstas, la secreción mucosa de las células caliciformes (Freitas y Cayuela, 2000). Esta secreción es un gel formado por mucinas, proteínas que poseen cadenas de oligosacáridos unidos a serinas, prolinas y treoninas, pudiendo representar la parte glucídica hasta el 80% de la masa molecular (Liévin y Servin, 2006). Además de proteger y lubricar la superficie de la mucosa, el gel constituye una barrera para ciertos enteropatógenos como *Yersinia enterocolitica* o *Shigella flexneri*, así como para los rotavirus (Liévin y Servin, 2006). Las mucinas son degradadas por glicosidasas y estererasas de bacterias de la microbiota (Freitas y Cayuela, 2000), lo que suministra nutrientes para el crecimiento bacteriano, de lo que se pueden aprovechar también algunos microorganismos patógenos que se adhieren al mucus (Macfarlane *et al.*, 2000).

2.3 Microbiota del tracto digestivo

Dado que el calostro materno, en condiciones normales, es un ambiente estéril, los mamíferos nacen sin microorganismos comensales, pero la colonización de los distintos nichos biológicos que ofrece el organismo comienza al atravesar el canal del parto y prosigue hasta el establecimiento de comunidades microbianas estables.

Durante los primeros días de vida la microbiota está compuesta principalmente por enterobacterias y estreptococos y se vuelve más diversa con el tiempo (Fig. 4) (Arunachalam, 1999). Se calcula que la microbiota del tracto digestivo de un adulto contiene hasta 10^{14} bacterias viables (Liévin y Servin, 2006).

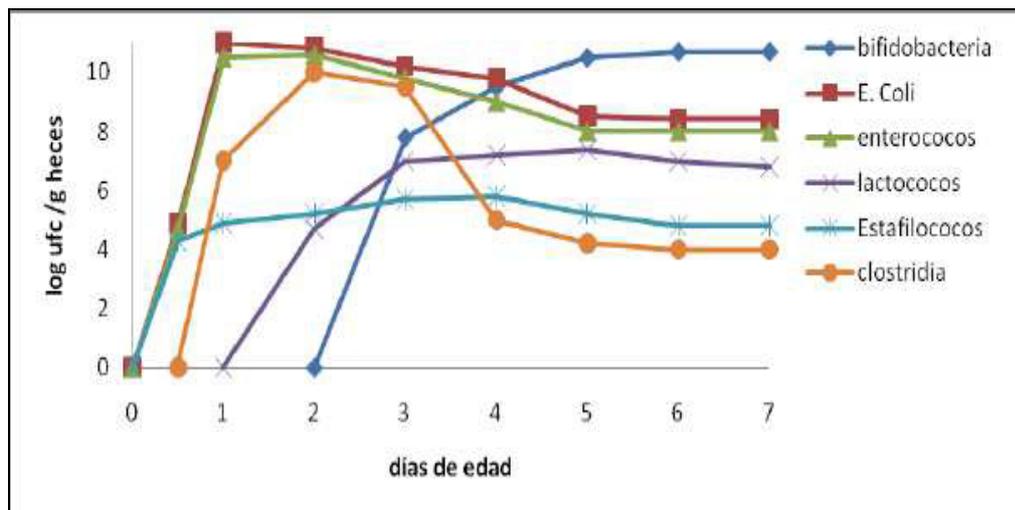


Fig. 4. Cambios en la microbiota intestinal en infantes desde recién nacidos hasta 7 días de edad (tomado de Arunachalam, 1999).

En adultos sanos la composición de la microbiota varía entre individuos y se mantiene estable a través de una gran parte de nuestra vida. Se observó en pacientes ancianos que la composición fecal cambia con el incremento de la edad y disminuye el número total de bifidobacterias junto con la disminución de otra diversidad de especies (Woodmansey *et al.*, 2004). La presencia de bifidobacterias en heces humanas está asociada con el buen estado de salud y se ha encontrado que existen diferencias al comparar la composición microbiana entre individuos sanos y enfermos (Seksi *et al.*, 2003).

El aparato digestivo, donde existen más de 400 especies bacterianas (Tannock, 1999) más de la mitad del peso de la materia que se encuentra en el colon corresponde a células bacterianas cuyo número es diez veces superior al de las células de los tejidos que constituyen el cuerpo humano. El estómago contiene normalmente pocas bacterias (10^3 UFC/mL de jugo gástrico), mientras que la concentración bacteriana aumenta a lo largo del intestino hasta llegar a una concentración final en el colon de 10^{12} UFC/g.

La mayoría de las bacterias ingeridas con la saliva o los alimentos no son capaces de sobrevivir mucho tiempo en el estómago, dada la acidez del pH gástrico, que sólo permite la supervivencia de especies ácido-tolerantes como algunos estreptococcus, lactobacilos y *Helicobacter pylori*. En el intestino delgado el pH se neutraliza, los microorganismos viables puede elevarse hasta 10^9 en el íleon; las especies presentes pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Actinomyces* y *Bacteroides* así como a miembros de la familia *Enterobacterium*. En el intestino grueso existen anaerobios estrictos (géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*) y en menor cantidad anaerobios facultativos como las enterobacterias (Figs. 5 y 6) (Kleessen *et al.*, 2000; Moreau y Gaboriau, 2000).

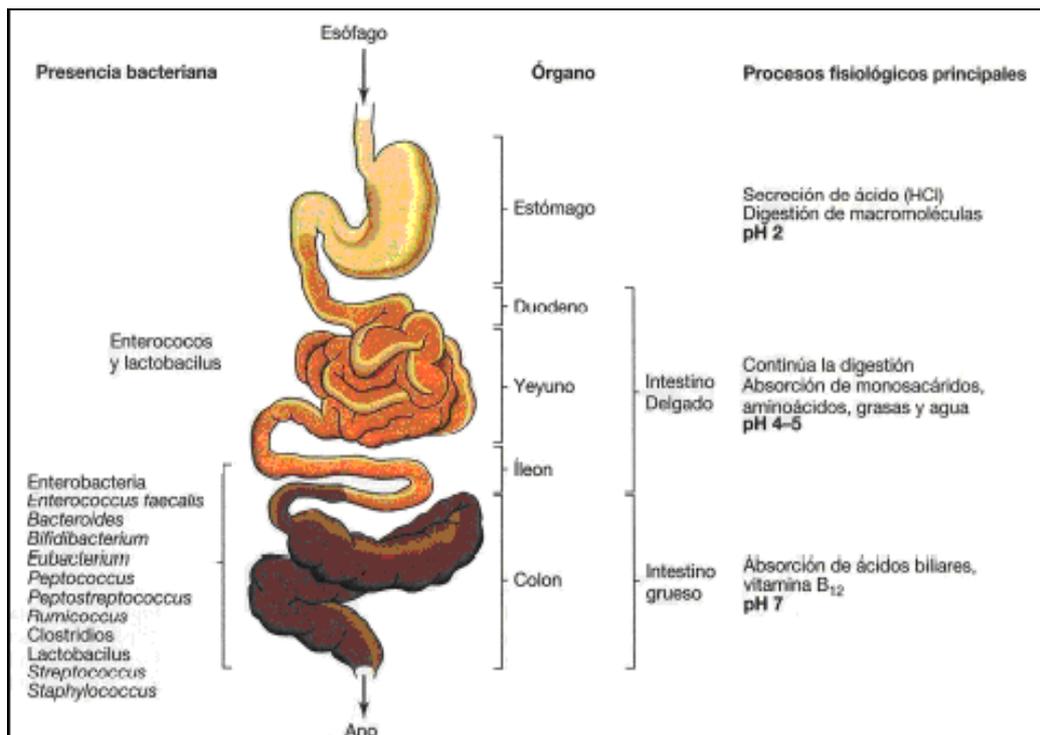


Fig. 5. Microbiota del tracto digestivo (imagen tomada de Madigan *et al.*, 2006).

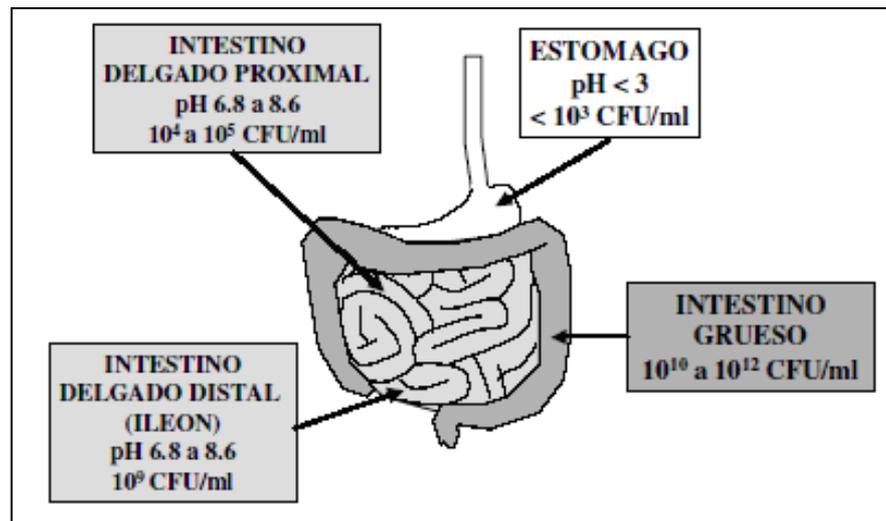


Fig. 6. Concentración de microorganismos en el tracto Gastrointestinal (imagen tomada de Bujalance, 2006).

La configuración definitiva de la microbiota intestinal es el resultado de dos tipos de presiones selectivas: “desde arriba”, las presiones impuestas por el hospedador, lo que incluye las características de los nichos ecológicos ofrecidos y los mecanismos inmunitarios, y que seleccionan una diversidad de linajes microbianos cuyos genomas contienen conjuntos similares de genes (redundancia funcional); y “desde abajo”, las presiones debidas a la competición entre microorganismos, lo que promueve la selección de genomas especializados, con conjuntos de genes funcionalmente distintos (Ley *et al.*, 2006). Una vez establecidas, las poblaciones que constituyen la microbiota intestinal son estables, aunque algunos estudios longitudinales muestran variaciones en los recuentos de determinadas especies, como *Bacteroides thetaiotaomicron* o *Clostridium perfringens* (Kleessen *et al.*, 2000). Incluso después de las perturbaciones inducidas por tratamientos antimicrobianos, las poblaciones originales retornan (De La Cochetière *et al.*, 2005). Es interesante reseñar que, en opinión de expertos, la administración de prebióticos puede tener un impacto mayor sobre la microbiota que la de probióticos (Walker y Buckley, 2006); es el caso de la administración de inulina, que incrementa el número de bifidobacterias indígenas (Gibson *et al.*, 1995).

Entre las funciones atribuidas a la microbiota intestinal se pueden citar las siguientes: modificación del contenido intestinal (pH, potencial redox, producción de metabolitos como vitaminas y enzimas digestivas), modificaciones anatómico-funcionales del tracto digestivo (disminución del volumen fecal por acción mucolítica, tasa de renovación de enterocitos, diferenciación de las células de la mucosa, aceleración del tránsito intestinal), resistencia a infecciones intestinales (por mecanismos directos como la competencia por nutrientes o la producción de sustancias antibióticas, e indirectos a través de la potenciación de la inmunidad mucosal), desarrollo del GALT (tejido linfoide asociado a intestino) y regulación de los mecanismos inmunitarios (Fig. 7) (Moreau y Gaboriau, 2000; Liévin y Servin, 2006).

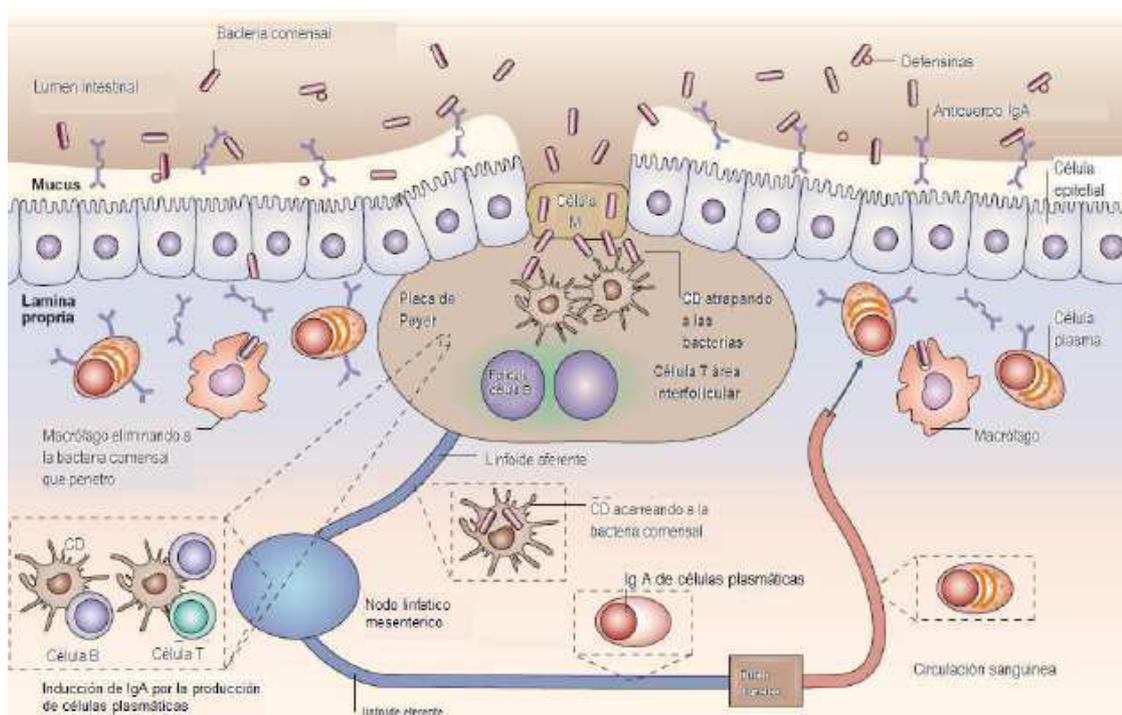


Fig. 7. Defensa inmune contra la bacteria comensal del intestino (imagen tomada de González, 2009).

Una función importante de la microbiota es su contribución al desarrollo de la mucosa. Los glicoconjugados que constituyen el glicocálix de las células de la mucosa intestinal tienen una gran importancia ya que están implicados en mecanismos de reconocimiento molecular que incluyen procesos de adhesión y diferenciación celular, regulación, comunicación y transducción de señales e infección por bacterias y virus (Freitas y Cayuela, 2000).

2.4 Importancia de los probióticos en la flora gastrointestinal

El colon es uno de los órganos metabólicamente más activos del cuerpo humano, y juega un papel muy importante en la nutrición y en la salud. Entre los distintos componentes de la microflora colonica se encuentran algunas bacterias (bifidobacterias y lactobacilos) que impiden el crecimiento de las bacterias nocivas para la salud humana y, por ello, en la actualidad hay un gran interés en mejorar el desarrollo de las que son benéficas, disminuyendo así el crecimiento de las potencialmente patógenas. Ningún organismo elabora bacterias, es decir, no las genera, simplemente éstas se hospedan en nuestro intestino. Su incorporación es siempre externa. Durante la vida intrauterina, la luz intestinal permanece estéril pero la colonización comienza inmediatamente luego del nacimiento y alcanza una estabilidad duradera hacia el primer año de vida. Dicha estabilidad puede ser alterada durante episodios de infecciones intestinales, tratamientos con antibióticos, inmunodeficiencias transitorias o crónicas y en la vejez (Mateos, 2002).

La microbiota siempre está activa y se renueva aproximadamente cada 48 h. Un factor externo que incide en la composición de la flora es la dieta y esto es particularmente evidente durante la lactancia. Los microorganismos intestinales comprenden alrededor de 100 especies, en un número de 10^{14} células individuales colonizan la parte baja del intestino delgado y el intestino grueso, donde hay ausencia de oxígeno, formando un ecosistema de la microflora intestinal. Esta

flora incluye microorganismos benéficos, patógenos y neutrales, los cuales tienen relación estrecha con la salud. El pequeño porcentaje de microorganismos patógenos es de gran importancia, ya que van a tener en alerta al sistema inmunológico, reactivando las defensas locales, en cada parte del tracto digestivo (Rasic y Kurmann, 1983). Por esto al intestino se le denomina “la cuna del sistema inmune” (Keseel y Klupsch, 1984). Las bifidobacterias son las más importantes para la salud, ya que ayudan a tener un buen equilibrio con toda la flora intestinal.

En términos microbiológicos, el tracto gastrointestinal (GI) puede ser entendido en función de tres regiones principales: estómago, intestino y colon; cada una de las cuales poseen una disposición de la población microbiana muy singular (Rastall, 2004). La microflora del colon se ha convertido en el objetivo principal de las intervenciones dietéticas, debido a que estos microorganismos ayudan a completar la digestión (a través del proceso de fermentación) protegen contra las bacterias patógenas y estimulan el desarrollo del sistema inmune (Macfarlane y Cummings, 1999).

La cantidad de oxígeno presente en el tracto digestivo depende del sitio mientras hay una cantidad apreciable en el estómago e intestino delgado, el segmento inferior del intestino delgado y el intestino grueso contienen muy poco. La distribución intestinal de los microorganismos depende de la cantidad de oxígeno presente. Las bacterias ácido lácticas, que se desarrollan independientes de la cantidad de oxígeno presente (anaeróbicas facultativas), colonizan el intestino delgado. Las bifidobacterias, las cuales sobreviven y se desarrollan en ausencia de oxígeno (anaerobias obligadas), predominan en el intestino grueso.

El estómago y la parte superior del intestino delgado contienen pocas bacterias, ya que allí los alimentos se mueven más rápidamente, además la saliva contiene lisozima, que es una enzima bacteriolítica, el pH del fluido gástrico es demasiado bajo y el pH de la bilis es demasiado alto. Cada región del tracto gastrointestinal

posee una disposición de la población microbiana muy singular así se observa en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2.
Características de la microbiota del tracto gastrointestinal

Región Gastrointestinal	Características de la microflora	Ejemplos
Estómago	-Muy bajo número de bacterias -Presencia de anaerobios facultativos -Presencia de solo 10^3 UFC/ mL -pH ácido	- <i>Lactobacilos spp.</i> - <i>Streptococos spp.</i>
Intestino	-Mayor carga bacteriana. -Presencia de anaerobios, enterobacterias y anaerobios facultativos.	- <i>Lactobacilos spp.</i> - <i>Streptococos spp.</i> - <i>Bifidobacterium spp.</i> - <i>Bacteroides spp.</i> - <i>Clostridium spp.</i>
Colon	-La región con mayor carga bacteriana -Presencia de 10^{11} - 10^{12} (UFC)/ mL -Presencia de anaerobios estrictos, enterobacterias y anaerobios facultativos, en menor medida.	- <i>Peptococos spp.</i> - <i>Bifidobacterium spp.</i> - <i>Bacteroides spp.</i> - <i>Clostridium spp.</i> - <i>Atopobium spp.</i>

Tomado de Rastall (2004)

El uso de probióticos ha sido estudiado en varias patologías digestivas, entre ellas aquellas que incluyen alteración en el equilibrio de la flora gastrointestinal, siendo las más comunes: la diarrea asociada al empleo de antibióticos, la diarrea aguda (sobre todo en población pediátrica), la intolerancia a la lactosa, el síndrome de intestino irritable, las infecciones por *H. pylori* y la enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras (Martínez, 2001). En los últimos años, los probióticos han adquirido una considerable importancia como microorganismos capaces de ejercer un beneficio sobre la salud, por ejemplo en la prevención y en el tratamiento de desórdenes intestinales, en la reducción del riesgo de cáncer o en la modulación de la respuesta inmune, tal como lo demostró Bujalance *et al.*, 2007 en un estudio donde empleó *L. plantarum* como inmunomodulador; ya que este estimuló significativamente a los esplenocitos en respuesta a la concavalina A y al mitógeno de las células T (Puertollano *et al.*, 2005).

2.5 Cáncer

Una de las situaciones clínicas reseñadas como susceptibles de ser mejoradas por la ingestión de probióticos es la aparición de carcinoma de colon (Ruiz *et al.*, 1992). En el mundo el cáncer colorrectal ocupa el cuarto lugar con 608 000 defunciones (OMS, 2008). En México, durante 2010 se observó que los principales tumores malignos que afectan a la población femenina adulta (de 20 años y más) que fue hospitalizada por este diagnóstico eran el cáncer de mama (24.3%), el cervicouterino (9.7%) y el de colon (3.2%); mientras que en los varones adultos se concentran en cáncer de próstata (7.9%), bronquios y pulmón (4.9%) y colon (4.6%). En 2011, entre los principales tumores malignos por lo que fallece la población de 20 años y más en México, se observan diferencias significativas entre hombres y mujeres. Las mujeres mueren por cáncer de mama (13.8%), cervicouterino (10.4%), de estómago (7%), hígado y vías biliares intrahepáticas (5.5%) y de colon (4.3%). En tanto que los hombres fallecen por cáncer de próstata (16.9%), de bronquios y pulmón (12.8%), de estómago (8.6%), hígado y vías biliares intrahepáticas (5.3%) y de colon (5.3%) (INEGI, 2011).

El tumor de cáncer de colon se inicia por acción de carcinógenos químicos mutágenos, y se le reconoce un desarrollo gradual, por etapas que abarcan desde lesiones pretumorales (epitelio hiperplásico), pasando por varias formas de adenomas, hasta llegar al carcinoma invasor y metastásico, estando cada etapa definida por la activación de oncogenes o la inactivación de diversos genes supresores (Ruiz *et al.*, 1992).

Los hábitos alimenticios en las áreas de gran incidencia incluyen la ingesta calórica en exceso del requerimiento, bajo contenido de vegetales no absorbibles (fibra), preferencia de carne roja, exceso en el consumo de carbohidratos refinados con bajo contenido micronutrientes que dan protección. La digestión de algunos de estos productos ha sido encontrada capaz de potenciar carcinogénesis produciendo daño en el DNA en las células de las criptas liderando mutación de

genes que se incluyen adenomatous polyposis coli (APC), Kirsten-ras (K-ras) y p53 (proteína 53 kilodaltones) (Fotiadis *et al.*, 2008; Sidhus *et al.*, 2010).

Algunos investigadores han demostrado la propiedad detoxificante y antimutagénica de microflora bacteriana intestinal no patógena (probióticos) e ingredientes no digestibles (prebióticos) con la conclusión que ambos tienen efectos benéficos en cáncer colorrectal (CRC) (Fotiadis *et al.*, 2008; Wollowski *et al.*, 2001; Prebiotics, 2010). A pesar de la cirugía, seguida por quimio y radioterapia, la tasa de éxito del tratamiento CRC sigue variable con alta tasa de mortalidad (Liong, 2008).

Se ha demostrado que el crecimiento de bacterias que liberan enzimas carcinogénicas, se inhibe por bajo pH y probióticos (*L. acidophilus* y *B. bifidum*), se ha reportado pH bajo en heces fecales con baja proliferación de colonias en criptas (Fotiadis *et al.*, 2008; Biasco *et al.*, 1991). Una dieta alta en grasa es considerada factor de riesgo de CRC porque el colesterol es convertido a ácidos biliares primarios en el hígado con subsecuente ácido biliar secundario en el colon por la acción de 7 α -dehydroxylase bacteriana (Fotiadis *et al.*, 2008; Weisburger y Wynder, 1987).

Estos ácidos biliares secundarios (particularmente el ácido litocólico) son citotóxicos en el epitelio del colon e incrementan la proliferación de células intestinales (Fotiadis *et al.*, 2008; Bruce, 1987). Lidbeck *et al.* (1991), demostraron una baja concentración de ácidos biliares secundarios en heces por la administración de leches fermentadas suplementadas con *L. acidophilus*. Por lo tanto, el efecto protector de los probióticos frente al cáncer puede deberse a la propiedad de bajo pH en el colon como la reducción de la formación de los ácidos biliares secundarios (Fotiadis *et al.*, 2008). El pH del colon en personas sanas varía de 4.5 a 7 (Madigan *et al.*, 2004).

En su revisión sobre la prevención de cáncer de colon por probióticos, Brady *et al.*, 2000; recogen un total de 24 observaciones sobre probióticos y tumores de colon, incluyendo datos de principios de los 80, que describen la reducción por derivados lácteos fermentados por bacterias del ácido láctico, de la tumorigénesis experimentalmente inducida en ratas Brady *et al.* (2000); concluyeron que existen una serie de estudios, en modelos animales, probando una relación inversa entre el consumo de probióticos y aparición de criptas aberrantes o el desarrollo de tumores en el colon, así como evidencias sobre el sinergismo antitumoral del consumo de probióticos y prebióticos (fructo-oligosacáridos).

Hay algunos datos iniciales que indican que los microorganismos probióticos pueden impedir o retrasar la aparición de ciertos tipos de cáncer (Fig. 8). Esto se desprende del conocimiento de que los elementos que constituyen la microflora intestinal pueden producir sustancias carcinógenas como las nitrosaminas. Por consiguiente, la administración de lactobacilos y bifidobacterias podría teóricamente modificar la flora, dando lugar a una reducción de los niveles de enzimas pro-carcinogénicas como la nitroreductasa, azoreductasa (Mennickent y Green, 2009) y β -glucuronidasa y sustancias carcinógenas (Hosada *et al.*, 1996). Por otra parte, hay algunos indicios de que la instalación intestinal de probióticos, incluido *L. casei* Shirota, puede reducir las reapariciones del cáncer en otros sitios, como la vejiga urinaria (Aso *et al.*, 1995).

Estudios *in vitro* con *L. rhamnosus* GG y bifidobacterias y un estudio *in vivo* utilizando cepas GG y LC-705 de *L. rhamnosus*, así como *Propionibacterium sp*, demostraron una disminución de la disponibilidad de aflatoxina carcinógena en el lumen (El-Nezami *et al.*, 2000; Oatley *et al.*, 2000).

Matsumoto y Benno (2004) realizaron un estudio con voluntarios humanos, demostrando que el consumo de yogurt conteniendo *B. lactis* LKM512 incrementa el contenido fecal en espermidina y disminuye la mutagenicidad de las heces; los autores especulan que la espermidina producida por estas bacterias podría jugar un papel como estabilizador del DNA celular, al que protegerían de los efectos

genotóxicos de los carcinógenos. Los ácidos grasos de cadena corta también son candidatos, en especial el butírico, por sus efectos protectores sobre los enterocitos (Fig. 8) (Wong *et al.*, 2006).

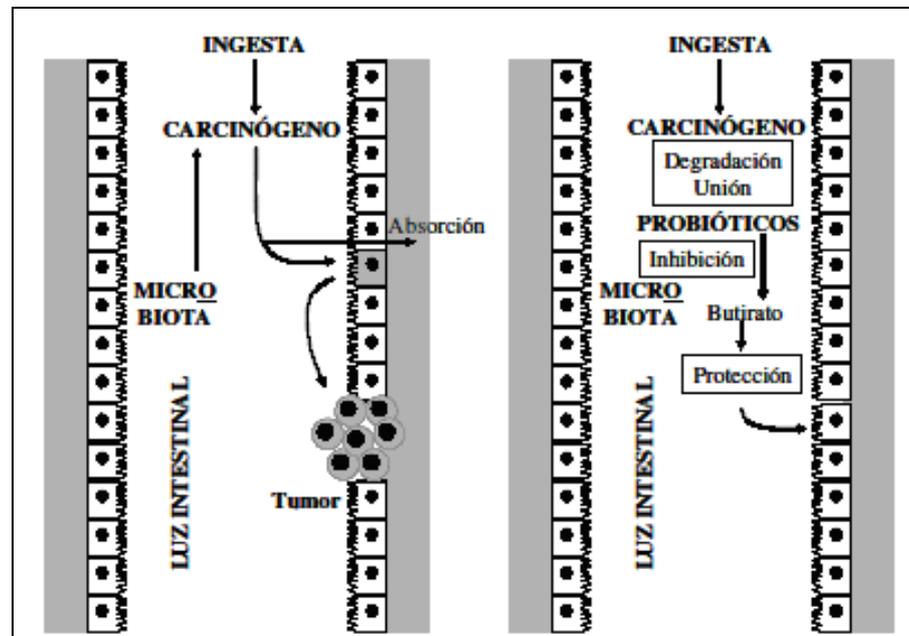


Fig. 8. Mecanismos directos de acción antitumoral atribuidos a microorganismos probióticos (imagen tomada de Bujalance, 2006).

Durante las últimas 2 décadas, algunos estudios animales han demostrado el efecto de protección de probióticos en cáncer colorrectal. En la administración de probióticos a ratas ha sido encontrada baja incidencia de lesiones precancerosas (focos de criptas aberrantes FCA) en el colon (Rowland, 2008). FCA es conocido porque precede la neoplasia colorrectal, la medida de su desarrollo es útil para predecir la existencia de cáncer colorrectal. Usando azoximetano (AOM) se induce la formación de FCA en ratas. A este respecto, Reddy *et al.* (1997) reportaron que un mayor crecimiento de bifidobacterias en el colon, lo cual puede resultar en la inhibición del desarrollo de FCA y multiplicidad de las criptas, lo cual fue atribuido a la reducción de pH por colonias de microorganismos que fueron responsables de inhibir el crecimiento de *E. coli* y *Clostridium*.

Kulkarni y Reddy (1994) reportaron que bajo un esquema de alimentación con *Bifidobacterium longum*, se presentaba una inhibición en la formación de FCA en el 50% de ratas tratadas. Una investigación similar realizada por Challa *et al.* (1997) demostró una reducción del 23% en total colonización de FCA y un 28% en total de cripta aberrante (AC) en ratas con una dieta que contenía 0.5% de *B. longum* (1×10^8 células viables/g de alimento). A los animales se les dio la dieta experimental anterior al tratamiento con AOM y durante el experimento.

Ciertos xenobióticos mutagénicos, después de la absorción, son detoxificados en el hígado por conjugación con ácido glucurónico y son de nuevo liberados en el intestino como glucurónicos conjugados.

En el tracto gastrointestinal, bacterias como enterobacterias y clostridios causan regeneración (liberación) de aglicones tóxicos mutagénicos *de novo* de los conjugados de la liberación de enzimas como β -glucuronidasa, nitroreductasa y azoreductasa (Fotiadis *et al.*, 2008; Wollowski *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha encontrado que ciertas cadenas de lactobacilos y bifidobacterias disminuyen la concentración y actividad de estas enzimas xenobióticas metabolizantes y es probable que reducen el nivel de lesión preneoplásica o tumor en el tracto gastrointestinal (Fotiadis *et al.*, 2008; Wollowski *et al.*, 2001; Burns y Rowland, 2000). Por lo mismo se ha propuesto que la actividad anticancerígena de los probióticos puede ser debido a la inactivación de las enzimas bacterianas intestinales procarcinogénicas (Liong, 2008; Geier *et al.*, 2006).

Baricault *et al.* (1995) estudiaron el efecto de diferentes leches fermentadas en células de cáncer de colon usando una línea celular de células de cáncer de colon humanas (HT-29). Para la leche fermentada, utilizaron cepas de *L. helveticus*, *Bifidobacterium*, *L. acidophilus* o una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Los resultados demostraron una disminución en el crecimiento de 10-50% de las células HT-29 tratadas.

A partir de una investigación en ratas, Singh *et al.* (1997) llegaron a la conclusión de que AOM inducido por la proliferación celular se inhibe con la ingestión de *B. longum* a través de una disminución de la ornitina descarboxilasa (ODC). Como ODC está involucrada en la biosíntesis de poliaminas que ayudan en la célula a la proliferación, diferenciación y síntesis de macromoléculas, concluyeron que se mejora la actividad de la ODC con un estado de hiperproliferativo de la mucosa del colon que puede llevar a adenomas de colon y carcinomas. También encontraron una expresión baja de la oncoproteína ras-p21 cuando las ratas fueron alimentadas con *B. longum* (Singh *et al.*, 1997).

Se ha observado que la descomposición anaerobia de prebióticos y su subsecuente fermentación por probióticos no solo promueve su crecimiento, sino también conduce a la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) como butirato, acetato y propionato y varias cantidad de bioproductos de fermentación. Estos SCFAs disminuyen el pH del colon, el cual contribuye a la acción anticáncer (Wollowski *et al.*, 2001).

El butirato de sodio es un SCFA que tiene efectos a nivel molecular, celular y tisular. Es conocido por ser un inhibidor de la deacetilasa de histonas (HDACs). En las células, el butirato de sodio modifica la expresión de un grupo de genes que contienen elementos de respuesta al butirato. El butirato de sodio también induce la detención del crecimiento, diferenciación y apoptosis de células cancerosas, principalmente por su efecto sobre la actividad del HDAC (Domokos *et al.*, 2010; Garczarczyk *et al.*, 2010). Además, suprime la inflamación, en parte reduciendo la expresión de citoquinas pro- inflamatorias como el interferon- γ , la interleucina (IL)-6 y la IL-1 β por medio de la inhibición específica de la ruta NF- κ B (Kim *et al.*, 2004).

La presencia de butirato en el intestino delgado puede ser un factor esencial en el mantenimiento y reparación de la mucosa (Wächtershäuser y Stein, 2000). El butirato propicia efectos sistémicos indirectos, como la instilación de los SCFAs

en el colon que estimula la proliferación de células no solo en la mucosa del colon sino también en tejidos no expuestos, como el epitelio del colon adyacente, el íleon o el yeyuno. El butirato aumenta la producción de hormonas enterotrópicas, y estimula el sistema nervioso entérico (Rombeau *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1998). El butirato estimula la secreción de enzimas digestivas en el tracto gastrointestinal y en el páncreas. Además de su actividad antineoplásica, el butirato de sodio induce cambios en la morfología celular, modifica la expresión de genes celulares, regula la acción hormonal y los receptores de hormonas, así como los receptores de los factores de crecimiento (tomado de www.norel.es).

El colon humano absorbe una cantidad significativa de ácidos grasos de cadena corta. Estos tienen un pKa alrededor de 4,8 y están ionizados en más del 99% dado el pH que normalmente existe en el colon. Son rápidamente absorbidos por el epitelio del colon y permanecen en el lumen solo en pacientes que sufren un sobrecrecimiento bacteriano. Normalmente, menos de un 10% del total de los ácidos grasos de cadena corta producidos se pierden en las deposiciones. La absorción de los AGCC ionizados se produce por medio de un transportador electrogénicamente neutro, por intercambio de iones: $\text{HCO}_3^-/\text{AGCC}$. Estos transportadores existen en el ribete y en la membrana basolateral de los colonocitos. La absorción de AGCC estimula la absorción de Na^+ , K^+ y agua. Este proceso significa, además, una conservación de energía considerable (tomado de escuela.med.puc.cl).

Células de colon tratadas con butirato son protegidas contra el daño de oxidación por peróxido de hidrógeno que las células que no son tratadas. En células de colon, se ha observado que el butirato incrementa la formación de glutatión S-transferasa, la cual es una enzima importante involucrada en la detoxificación de productos electrofílicos y compuestos asociados con estrés oxidativo (Wollowski *et al.*, 2001).

Recientes evidencias sugieren que el butirato puede inhibir la actividad genotóxica de nitrosaminas y de peróxido de hidrógeno en células de colon humanas. En humanos, la ingestión de probióticos han disminuido la concentración de sustancias genotóxicas en orina y también con altos niveles de compuestos que inducen oxidación de bases de DNA (Wollowski *et al.*, 2001).

Los probióticos incrementan la secreción de moco que previene adherencia y colonización de bacterias patógenas a lo largo de la pared intestinal y cierra la barrera por la disminución de la permeabilidad, esto previene la entrada de patógenos y alérgenos al torrente sanguíneo (Fig. 9) (<http://www.vitamintrader.com/articles/the-absolute-importance-of-probiotics/> accesado 4/oct/2013).

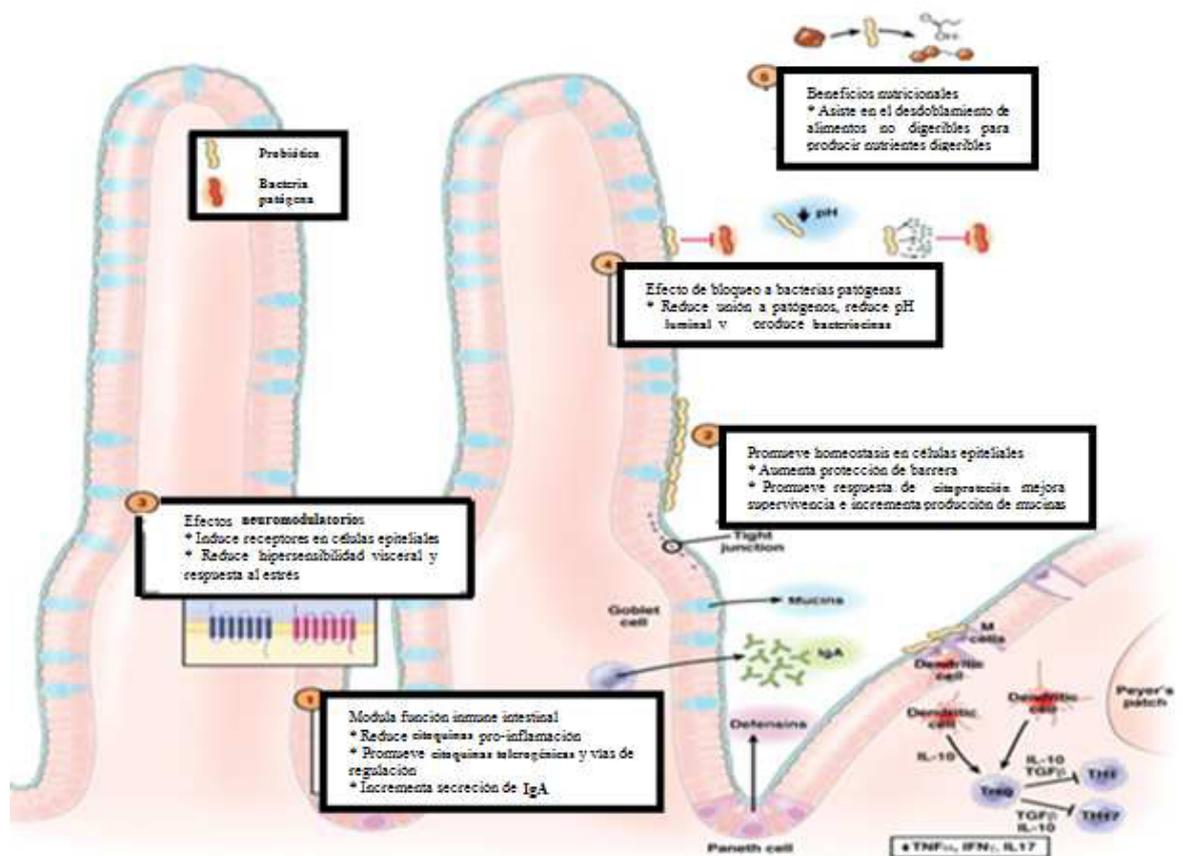


Fig. 9. Interferencia entre bacterias adheridas a las células epiteliales del intestino. La actividad de los probióticos es por la secreción de ácidos orgánicos, surfactantes y agentes antimicrobianos (tomado de Matthew, 2012).

Aunque los probióticos promueven el crecimiento de bacterias benéficas no patógenas al reducir el pH del colon, algunos de ellas también producen sustancias como bacteriocinas y antitoxinas, que inhiben las bacterias patógenas (Gupta y Garg, 2009 y <http://www.vitamintrader.com/articles/the-absolute-importance-of-probiotics/>). Además, se ha encontrado que liberan metabolitos protectores al intestino y regulan la motilidad intestinal (Gupta y Garg, 2009). Se ha discutido anteriormente que algunas cepas probióticas también pueden prevenir el daño genotóxico para el epitelio del colon (que se considera ser una etapa temprana del proceso carcinogénico).

Muchos de los carcinógenos transmitidos por los alimentos como aminos heterocíclicos y los hidrocarburos aromáticos policíclicos se inactivan por la conjugación con glutatión con la ayuda de la enzima glutatión S-transferasa (GST), que se encuentra en el hígado y otros tejidos incluyendo intestinal (Burns y Rowlan, 2000). Otras investigaciones han postulado que los probióticos poseen efectos protectores contra el cáncer de colon cambiando el proceso de diferenciación de las células tumorales.

2.5.1. Tratamiento para cáncer de colon y recto

Se pueden usar varios medicamentos para tratar el cáncer colorrectal. A menudo, se combinan dos o más de estos medicamentos para tratar que éstos sean más eficaces. El tratamiento se puede administrar de diferentes maneras:

Quimioterapia sistémica: la quimioterapia sistémica utiliza medicamentos que se suministran por una vena o por vía oral. Estos medicamentos ingresan al torrente sanguíneo y llegan a todas las áreas del cuerpo, haciendo que este tratamiento sea útil contra los tumores que se han propagado (metástasis) más allá del órgano en el cual se originaron.

Quimioterapia regional: en la quimioterapia regional, los medicamentos se inyectan directamente en una arteria que llega hasta la parte del cuerpo que contiene el tumor. Este método concentra la dosis de quimioterapia alcanzando así las células cancerosas. Además, reduce los efectos secundarios al limitar la cantidad que alcanza el resto de cuerpo. La quimioterapia se puede usar en fechas distintas durante el tratamiento de los cánceres de colon o de recto.

Quimioterapia adyuvante: se usa después de la cirugía para remover el cáncer se le conoce como quimioterapia adyuvante. Este tratamiento puede ayudar a evitar que el cáncer regrese y ha demostrado que ayuda a las personas con cáncer de colon y recto en etapa II y III a vivir por más tiempo. Se administra después de remover todo el cáncer visible para reducir la probabilidad de que regrese. Este tratamiento funciona al destruir el pequeño número de células cancerosas que haya podido quedar al momento de la cirugía, ya que eran tan pequeñas que no se podían ver. La

quimioterapia adyuvante también tiene el objetivo de destruir las células cancerosas que pudieran haber escapado del tumor primario y alojarse en otras partes del cuerpo (pero que son tan pequeñas que no se pueden observar en los estudios por imágenes).

La quimioterapia neoadyuvante: sólo para algunos tipos de cáncer, se administra (junto con la radiación) antes de la cirugía para tratar de reducir el tamaño del cáncer y así hacer más fácil la cirugía. A esto se le conoce como tratamiento neoadyuvante y a menudo se usa en el tratamiento del cáncer rectal.

La quimioterapia para los cánceres avanzados también se puede usar para ayudar a encoger tumores y a aliviar los síntomas de los cánceres que se han propagado a otros órganos, tal como el hígado. Aunque resulta poco probable que cure el cáncer, a menudo ayuda a las personas a vivir más tiempo.

Los medicamentos de quimioterapia son muy potentes, y pueden afectar algunas células sanas en el cuerpo. Los doctores administran los medicamentos en ciclos, con cada período de tratamiento seguido de un período de descanso para permitir que su cuerpo se recupere. Los ciclos de quimioterapia por lo general duran alrededor de 2 a 4 semanas, y las personas reciben usualmente al menos varios ciclos de tratamiento. Los medicamentos que se usan con más frecuencia para el cáncer colorrectal son:

- A) 5-fluorouracilo (5-FU), el cual a menudo se administra con el medicamento parecido a vitaminas, leucovorín, (también llamado ácido folínico), lo que mejora su eficacia.
- B) Capecitabina (Xeloda®), el cual se administra en forma de pastilla. Una vez que está en el cuerpo, este medicamento cambia a 5-FU cuando alcanza el lugar del tumor.
- C) Irinotecán (Camptosar®)
- D) Oxaliplatino (Eloxatin®)

Los efectos secundarios de la quimioterapia dependen del tipo y dosis de los medicamentos administrados, así como de la duración del tiempo que se administran. Los efectos secundarios comunes de los medicamentos pueden incluir:

- Caída del cabello
- Llagas en la boca
- Falta de apetito
- Náusea y vómito
- Bajos recuentos sanguíneos
- Probabilidad de infecciones (por bajos niveles de glóbulos blancos)
- Moretones o presentar sangrados (por bajos niveles de plaquetas)

Además de estos efectos, ciertas medicinas causan algunos efectos secundarios específicos, por ejemplo: síndrome de pies y manos, neuropatía y diarrea (tomado de www.cancer.org accesado 4/octubre/2013).

Cordero y Aristizábal (2002) y Parra y Aristizábal (2011) realizaron experimentos con doxorubicina HCl como control negativo de proliferación celular de HT-29, donde la línea celular mostró ser sensible al antineoplásico de manera *in vitro*.

2.6 Estrategias terapéuticas

Existen tres estrategias alimentarias que promueven el mantenimiento de un equilibrio más saludable de la microflora intestinal, consistentes en la alteración beneficiosa de su composición, mediante el incremento de las cantidades de bifidobacterias, de lactobacilos o de ambos basadas en la utilización de prebióticos, probióticos y simbióticos. Los probióticos son microorganismos vivos reconocidos como habitantes normales del intestino humano que, al ser ingeridos, potencian las propiedades de la flora intestinal.

Los prebióticos son ingredientes alimentarios (hidratos de carbono no digeribles) que poseen un efecto favorable sobre la flora intestinal ya que estimulan

selectivamente el crecimiento de bacterias benéficas. Los simbióticos son la combinación de pre y probióticos (Hertzler, 1996 y 2003).

Tanto los prebióticos como los probióticos son considerados alimentos funcionales, y se definen, como aquellos que contienen un componente, sea o no un nutriente, que afecta una o varias funciones del organismo en forma específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico que va más allá de su valor nutritivo tradicional de acuerdo a los recientes lineamientos de la OMS. Las estrategias terapéuticas actuales deben tomar en cuenta una terapia de interferencia microbiana, es decir, que permita mantener o restablecer un estado de salud mediante la introducción en el huésped de microorganismos vivos que permitan estabilizar el equilibrio de la flora intestinal.

En el campo de los derivados lácteos, después de varios años de investigación, ha salido al mercado lo que se llama los "cultivos biológicos" los cuales se diferencian de los tradicionales en que sobreviven el paso del estómago al intestino, y una vez allí son asimilados por el organismo, de forma que además de su alto valor nutritivo, poseen adicionalmente un importante carácter terapéutico. Este tipo de cultivo está compuesto por dos clases de bacterias, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* las cuales forman una asociación altamente productiva.

Es importante tener en cuenta que las bifidobacterias ingeridas con yogurt o sus compuestos estarán más protegidas de la acción de los jugos gástricos, asegurando su llegada al intestino. Se considera que la dosis diaria de bifidobacterias que debe ser ingerida para mantener una dominancia en el intestino es de 10^8 a 10^9 , en estas concentraciones se puede asegurar un efecto terapéutico.

Cuando el ser humano ingiere productos que contengan estas bacterias, éstas encuentran un hábitat adecuado en el intestino, y permanecen viables bajo condiciones normales. Ambos microorganismos son resistentes a sales biliares y a los pH bajos, condiciones normales en el paso por el estómago e intestino. En el

caso de los derivados lácteos que contienen las bacterias tradicionales, hay únicamente un aporte nutritivo, ya que generalmente vienen pasteurizados o han sido guardados a bajas temperaturas y ellas requieren una temperatura de más de 37° C para mantenerse vivas. No así cuando están liofilizadas, todavía en el empaque de la farmacia, entonces deben estar a 4° C y en algunas presentaciones (mesófilos, termófilos y otras para la industria), bajo 0°C. Las "bacterias biológicas" pueden adicionarse a la leche fresca o a sus derivados, convirtiéndolos así, en alimentos altamente nutritivos y terapéuticos. Este descubrimiento implica un paso gigante en el campo de la biotecnología, el cual debe darse a conocer a todos los niveles, desde los industriales, hasta los consumidores, pasando por los profesionales de la salud.

Pocos estudios han sido publicados apoyando la hipótesis de que la terapia del tipo prebiótico o probiótico, pudieran ser efectiva en el tratamiento de estas condiciones: *B. longm* empleando como probiótico, han logrado prevenir una translocación de bacterias (Ondarza, 2007). Las bifidobacterias y otras cepas de bacterias benéficas son estimuladoras de la síntesis de IgA. Por ello, se ha relacionado el consumo de ciertos alimentos prebióticos, que contienen estas cepas de bacterias, con una estimulación de las defensas (Mateos, 2002).

En trabajos recientes, se ha reportado la actividad inhibitoria de los factores extracelulares de varios probióticos sobre cultivos axénicos *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS (Barrón *et al.*, 2008; Zamora, 2008), *Giardia lamblia* (Calderón, 2011, Ontiveros, 2011) y *Trichomonas vaginalis* (Ontiveros, 2011), así como en las bacterias *Salmonella sp*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocitógenes*, *Serratia marscecens* (García, 2011). Estos resultados brindan la posibilidad de realizar experimentos empleando únicamente los metabolitos producto de los probióticos.

3. HIPÓTESIS

Los factores extracelulares de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum* presenten interferencia microbiana sobre la línea celular HT-29 de cáncer colorrectal en humano.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar la interferencia microbiana de factores extracelulares de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum* sobre la línea celular HT-29 de cáncer colorrectal en humano.

4.2 Objetivos Específicos

- Establecer el tiempo de producción de factores extracelulares mediante cinéticas de crecimiento de los probióticos *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum*.
- Determinar la interferencia microbiana de los factores extracelulares de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* sobre la línea celular HT-29 de cáncer colorrectal humano.
- Determinar la actividad citotóxica de los factores extracelulares de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* sobre leucocitos humanos.
- Determinar la concentración inhibitoria media de los factores extracelulares.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Material biológico

- A) Línea celular HT-29
- B) Leucocitos
- C) Probióticos
 - *Lactobacillus casei*
 - *L. plantarum*
 - *L. acidophilus*
 - *Bifidobacterium longum*

La línea celular y los probióticos se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection, 1994). Los leucocitos se obtuvieron de sangre donada por estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

5.2 Preparación de soluciones y medios de cultivo

La preparación de las soluciones y medios de cultivo que se emplearon en el desarrollo de este trabajo se describen en el anexo I.

5.3 Probióticos

5.3.1 Preparación de medio de cultivo MPT-caldo y MPT-agar: se preparó de acuerdo a las indicaciones mencionadas por Barrón *et al.*, 2008.

5.3.2. Mantenimiento: Las cepas de probióticos se mantienen en refrigeración a 4°C en MPT-caldo, cada cepa se activa tomando 500µL y se suspende en 5mL de MPT-caldo, se incuban por 24-48h a 37°C. Para la activación de cada cepa de bacterias y mantenimiento de las mismas, se toman bajo condiciones de esterilidad 0.5mL del cultivo de la cepa de las bacterias ácido lácticas en tubos borosilicato de 13x100mm conteniendo 5mL de MPT-caldo, se incuban a 37°C/18 h, posteriormente bajo condiciones de esterilidad se toman una asada de cada cultivo y se resembran por estría en tres tubos de borosilicato de 13x100mm conteniendo 5mL de MPT-agar inclinado, se incuban a 37°C/24 h, enseguida se guardan a 4°C por no más de tres meses.

5.4 Cinética de crecimiento

5.4.1 Método turbidimétrico: Se dispuso para cada de una de las cepas de probióticos, nueve tubos con tapón de rosca conteniendo 5mL de MPT-caldo, y frente al mechero, se inocularon con 500µL de cultivo de cada uno de los probióticos, e inmediatamente se tomó la primera lectura. Posteriormente se incuban en un baño de agua a 37°C y cada hora se realizaron las lecturas de absorbancia empleando un espectrofotómetro (Spectronic Genesis®) a una longitud de onda de 635nm durante un lapso de 24 h, se registró y se graficaron los valores obtenidos.

5.4.2 Método de recuento bacteriano en placa (RBP): Se reactivaron las bacterias probióticas, tomando una asada de una colonia del cultivo en MPT-agar y se depositaron en tres tubos de 13x100mm conteniendo 5mL de MPT-caldo, se procedió a incubar a 37°C durante 24h, transcurrido este tiempo se inocularon tres tubos de 13x100mm con 5mL de MPT-caldo con un inóculo al 1% y se incubaron a 37°C/24 h, después se inocularon 1% de cultivo en otros tres tubos de 13x100mm con 5mL de MPT-caldo con un inóculo de 1% y se incubaron a 37°C/14h, transcurrido este tiempo se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC)/mL empleando el método de dilución en placa; para realizar esta determinación se realizaron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-15} . A partir de las últimas diez diluciones se transfirieron 1 mL a una caja Petri enseguida se agregaron 15mL de MPT-agar, inmediatamente se giró la placa suavemente haciendo figuras de ochos invisibles en la mesa, esto para distribuir homogéneamente el inóculo a través del medio agar, se dejó solidificar, posteriormente se incubó a 37°C por 24h, después de este tiempo se contaron las colonias para determinar la cuenta de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

5.5 Obtención de factores extracelulares de probióticos: Los probióticos se reactivan antes de e iniciar cada bioensayo. A un litro de MPT-caldo se le inoculó 1% de cultivo de cada uno de los probióticos (incubado por 24h a 37°C dependiendo de

cada cepa) se incubó a 37°C por 24 h. El cultivo se colocó en frascos especiales y se centrifugó a 2500rpm por 10 min, se separó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente; este paso se repite hasta que se observe la ausencia del precipitado; el sobrenadante se esterilizó con filtración cuatro veces con filtros Millipore de 0.22µm, se le realizó la prueba de esterilidad, tomando una alícuota y colocándola en MPT-caldo para probióticos, se incubó a 37°C por 24 h y una vez aprobada dicha prueba de esterilidad, el sobrenadante estéril fue el medio con los factores extracelulares de los probióticos.

5.6 Obtención del liofilizado de los factores extracelulares (LFE) de probióticos: El sobrenadante filtrado se congeló por 24 h a -20°C y posteriormente se llevó la muestra de los factores extracelulares de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum* a un liofilizador. El liofilizado que se obtuvo se colocó en un frasco de vidrio estéril y se almacenó a -20°C hasta su empleo.

5.7 Línea celular.

5.7.1 Mantenimiento *in vitro*: Las células tumorales se mantuvieron en el medio AIM-V suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda, con un 5% de CO₂ en frascos de 25cm³.

5.7.2 Congelación de la línea celular: Para asegurar la disponibilidad de la línea en el laboratorio, se congelaron muestras (stocks) de aproximadamente 2x10⁷ cél/mL, para lo cual las células se concentraron mediante centrifugación a 1800 rpm durante 10min, se eliminó el sobrenadante y el concentrado celular se resuspendió en una solución de 70% medio AIM-V, 20% suero fetal bovino (SFB) y 10% DMSO como anticongelante que impide la formación de cristales de agua en el interior de las células manteniendo la integridad celular, y se dispensó 1mL por criotubo (Corning), este material se almacenó

a -80°C durante una semana y después se guardó en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento que fueran requerido.

5.8 Valoración de actividad biológica: Las células HT-29 de cáncer de colon humano que se encuentren en crecimiento exponencial, con un 90% de confluencia, trataron con una solución de tripsina 0.025%-EDTA 0.03% durante 15 minutos a 37°C, para obtener una suspensión celular que se contaron en cámara de Neubauer, empleando el método de exclusión del colorante azul de trypan. Se inocularon 5×10^4 células de cáncer de colon humano en placas de 96 pozos con fondo plano. Las placas se preincubaron por 24 h a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de aire, por 24 h, para permitir adherencia de las células en los pozos. Se realizaron diluciones seriadas 1:2 de la solución madre (430 mg/mL) de LFE de cada probiótico sobre las placas de 96 pozos de fondo plano, ajustando un volumen de 100 µL, incubando por un periodo de 48 h a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de aire. Además, se dejaron pozos con células mas medio AIM-V, como control positivo de crecimiento, como control negativo de crecimiento se utilizó Doxorubicina HCl y pozos sin células, pero con tratamiento como blancos (ver Fig. 10).

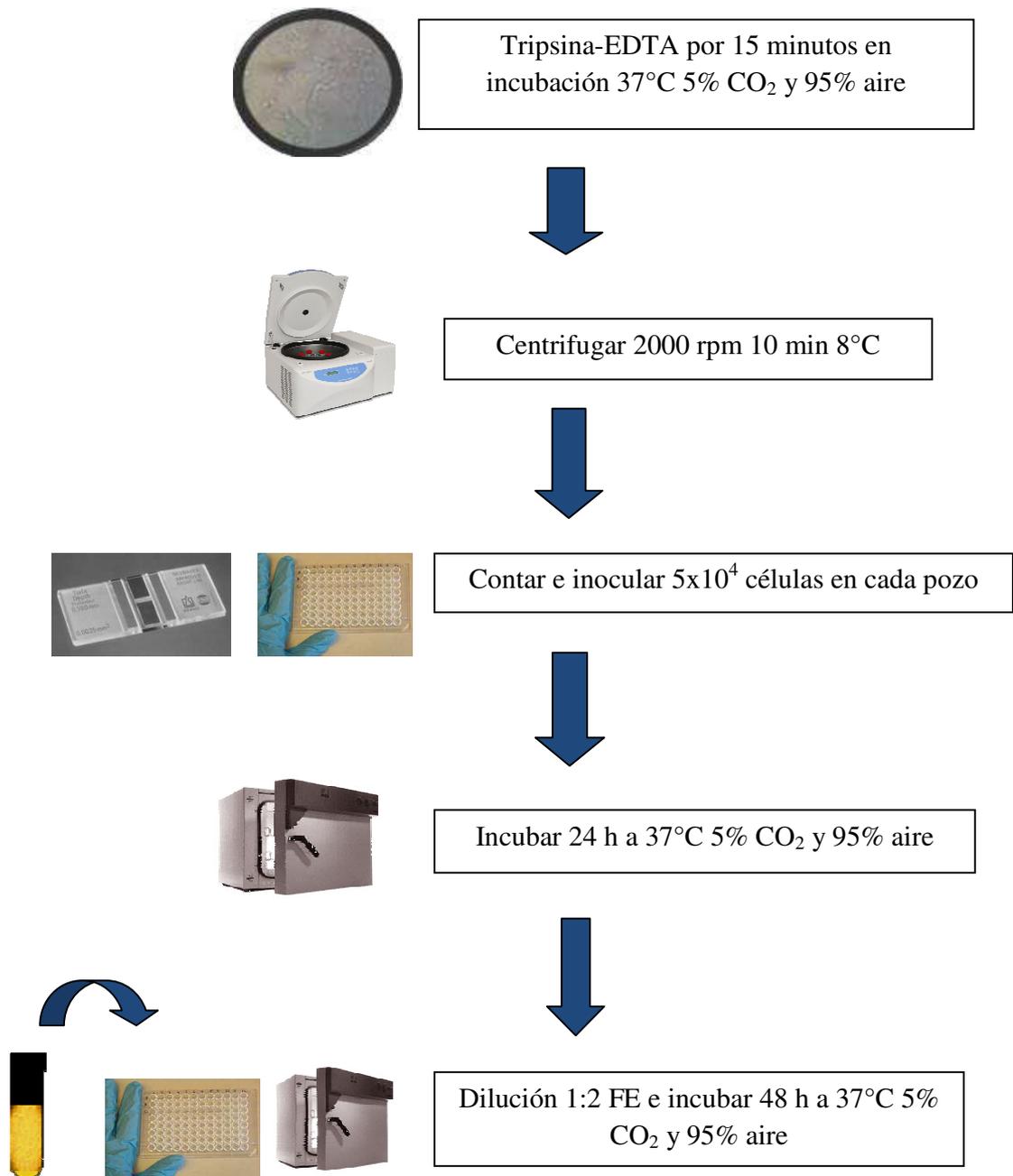


Fig. 10. Diseño experimental de valoración de actividad biológica. Procedimiento para medir la actividad biológica de los FE sobre la línea celular HT-29

Para evaluar el efecto citotóxico de los LFE de las cepas probióticas, se empleó el método fluorométrico indirecto de reducción del MTT, se agregó a cada pozo 15 μ L de MTT (0.5 mg/mL), se incubó por cuatro horas y posteriormente se agregó a cada pozo 80 μ L de DMSO y se tomó lectura a 570 nm de absorbancia (ver Fig. 11).

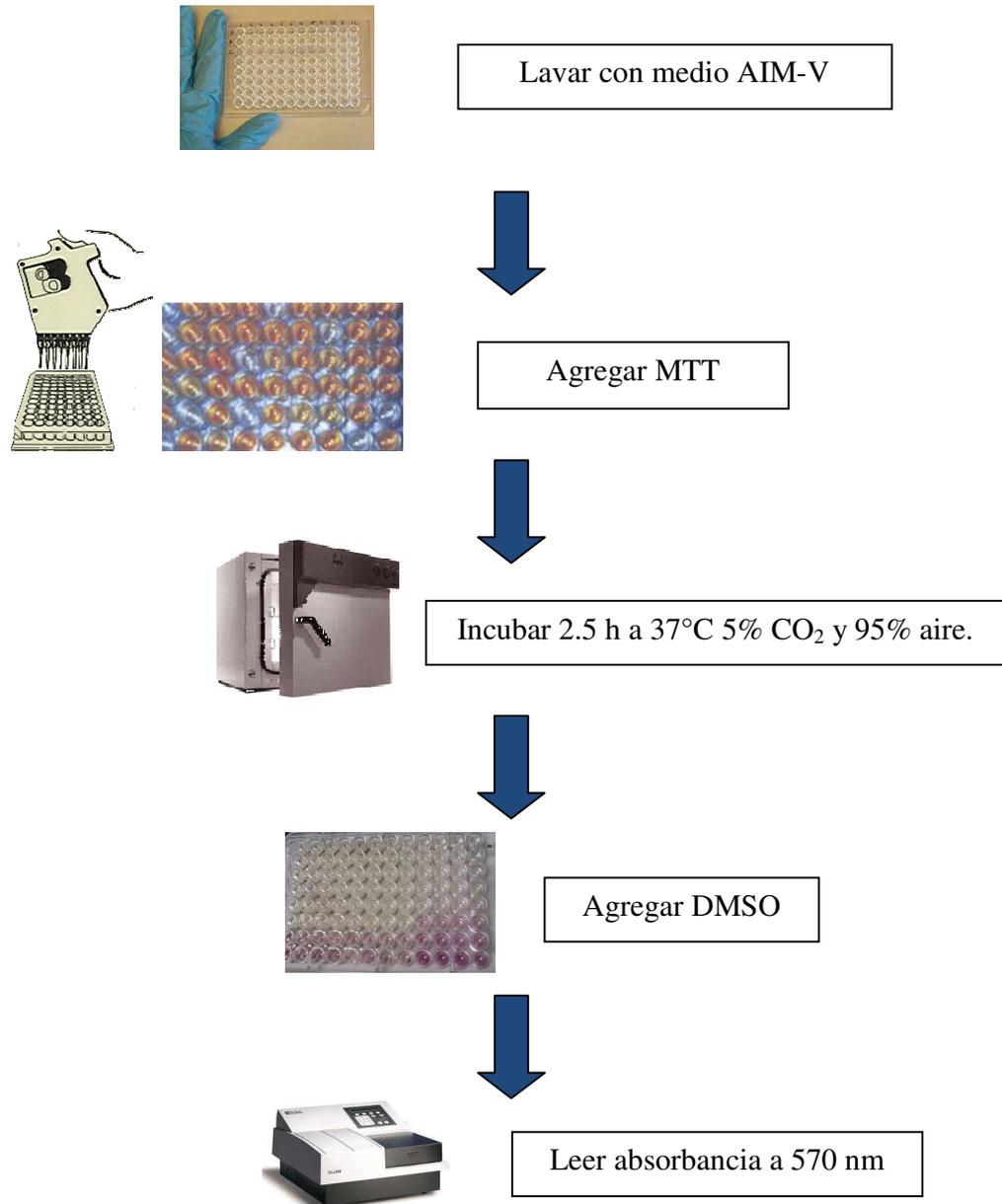


Fig. 11. Método del MTT. Método estandarizado para determinar la viabilidad celular.

5.8.1 Valoración citotóxica de leucocitos: Para evaluar si los LFE de las cepas probióticas son citotóxicos a las células mononucleares periféricas de la sangre humana, se obtuvieron cerca de 60mL de sangre de cuatro personas. La sangre fue mezclada con solución salina 0.85% y posteriormente se transfirió a tubos con Ficoll-Paque lentamente por la paredes y después pasó a centrifugación a 3000 rpm por 30 minutos.

La interfase blanca que se observó, son los leucocitos, los cuales se tomaron y transfirieron a otros tubos con solución salina 0.85% y se volvió a centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos. Después se resuspendieron en medio AIM-V y se ajustó el volumen a 1×10^6 células/mL. En una microplaca de 96 pozos, se agregaron 100 μ L de los LFE (las mismas 8 concentraciones que se utilizaron en el experimento con HT-29) y 100 μ L de células en 24 pozos de cada probiótico. Se utilizó también un control, el cual fue los LFE + leucocitos + concavalina A (ConA); este último se utilizó como mitógeno. Se usó la misma metodología a excepción al cultivar en la microplaca de 96 pozos, ahí en cada pozo se agregó 100 μ L de medio AIM-V, 80 μ L de células y 20 μ L de ConA. Asimismo hubo un tratamiento blanco el cual fue medio AIM-V y leucocitos; y, medio AIM-V con leucocitos y ConA. Se incubó por 48 horas y se utilizó el método del MTT para evaluar el efecto citotóxico, en las mismas condiciones que se usó para la HT-29.

5.9 Análisis estadístico

Para determinar el efecto de los LFE de probióticos sobre el crecimiento de las líneas celulares HT-29 se realizaron los siguientes análisis:

- Análisis estadístico de los resultados obtenidos de la actividad biológica de los LFE con el paquete estadístico SPSS para Windows® versión 2000 y se determinó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de los LFE mediante un análisis Probit.
- ANOVA $P < 0.05$ con una posterior comparación múltiple de medias.

6. RESULTADOS

6.1 Cinética de crecimiento

En la Fig. 12 se observa la gráfica correspondiente a la cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum* por el método turbidimétrico. La fase de adaptación ocurrió hasta la tercera hora, en las cuatro cepas probióticas el comportamiento fue similar. Para *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum* la fase exponencial fue a partir de la tercera hora hasta la novena hora, y después se presentó la fase estacionaria. Para *L. acidophilus* la fase exponencial fue a partir de la tercer hora hasta la séptima hora; esta cepa fue la que más rápido llegó a su fase estacionaria y obtuvo una lectura de absorbancia menor de 1.2nm; en contraste *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum* la lectura de absorbancia para su fase estacionaria fue de 1.6nm. Entre las cuatro cepas probióticas no hubo diferencias significativas.

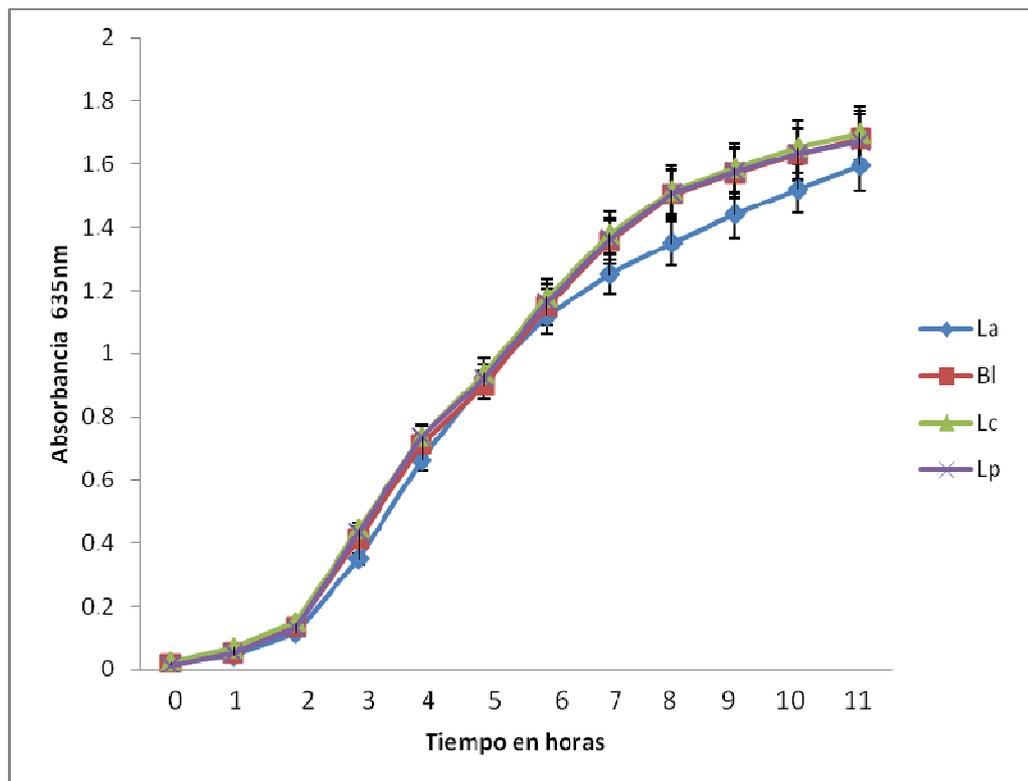


Fig. 12. Gráfica de la cinética de crecimiento de las bacterias probióticas.
 La cinética de crecimiento se llevó a cabo durante 12 horas mediante el método turbidimétrico.

6.2 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Después de 12 horas de incubación a 37°C, se realizó el recuento bacteriano en placa (RBP) para determinar las unidades formadoras de colonias. En la Fig. 13 se muestran los resultados de las UFC de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum*. Entre las cuatro cepas hubo una marcada diferencia significativa, siendo *L. acidophilus* la que mostró un mayor número de UFC (652.66×10^9) seguido por *L. plantarum* (89.33×10^9), *B. longum* (59×10^9) y *L. casei* con el menor número (35.33×10^9).

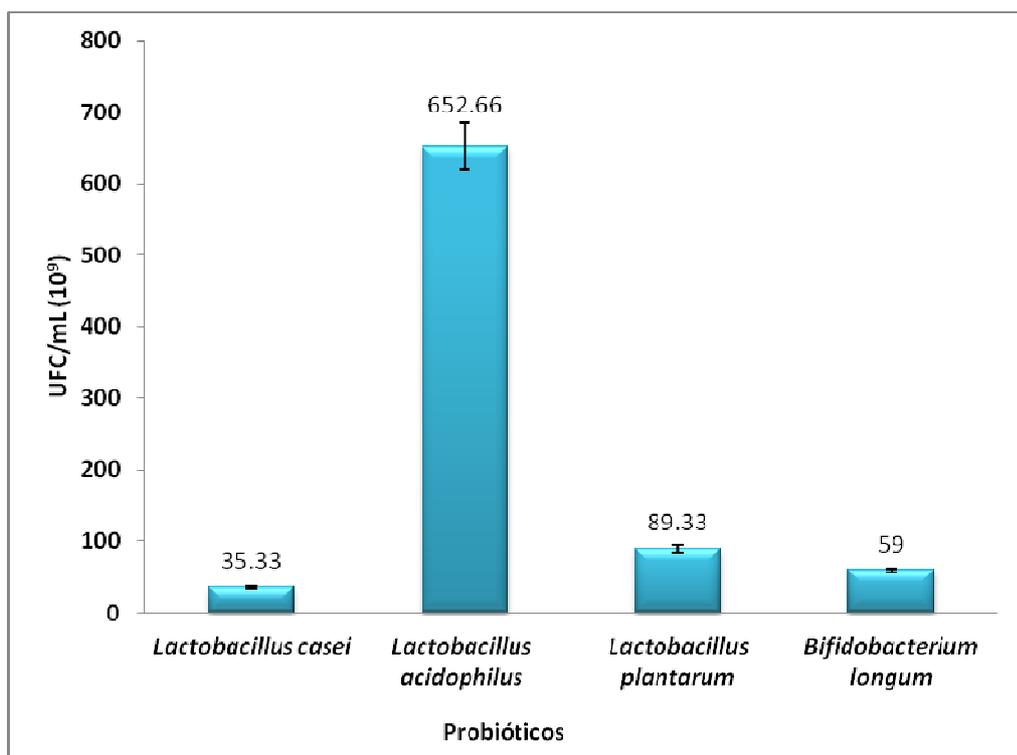


Fig 13. Resultado de las UFC de las bacterias probióticas. *L. acidophilus* mostró el mayor número de UFC seguido por *L. plantarum*, *B. longum* y *L. casei*, se observó que hubo gran diferencia significativa de *L. acidophilus* con respecto a las otras tres cepas.

6.3 Liofilizados de factores extracelulares (LFE)

Las características de los LFE de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum* se describen en la Tabla 3 y se observan en la Fig. 14.

Tabla 3.
Características de los LFE de las cepas probióticas

	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. longum</i>
pH	4.36	4.37	4.70	4.46
Color	café	rojo	amarillo	marrón
Textura	líquido	pegajoso	granulado	pegajoso
Rendimiento g/L	20	14	12	12



Fig. 14. Los LFE de las cepas probióticas. Aspecto de los LFE al finalizar el proceso de liofilización, los cuales presentaron diversos aspectos desde granular hasta pegajoso.

En los LFE, de las cuatro cepas probióticas, hubo un rango de pH de 4, siendo *L. casei* con el menor pH, de 4.36, esta misma cepa fue la que obtuvo un color más oscuro, textura líquida y el mayor rendimiento, de 20g/L. *L. plantarum* obtuvo un pH de 4.37, coloración roja, textura pegajosa y rendimiento de 14g/L. *L. acidophilus* tuvo un pH de 4.70, el cual fue el mayor de las otras cepas; color amarillo con textura granulada y rendimiento de 12g/L. *B. longum* obtuvo un pH de 4.46, coloración marrón, textura pegajosa y rendimiento de 12 g/L. Las cepas de *L. acidophilus* y *B. longum* fueron las que presentaron menor rendimiento.

6.4 Actividad biológica de los LFE sobre HT-29

En la Tabla 4 se muestran las absorbancias (570nm) de HT-29 frente a LFE de las cepas probióticas, asimismo el grupo control (células sin tratamiento). Fueron 3 eventos independientes donde las células HT-29 fueron incubadas 48 horas con las ocho diferentes diluciones de los LFE, y posteriormente, se utilizó el método turbidimétrico del MTT para analizar la viabilidad de la línea celular.

Tabla 4
Determinación de la interferencia microbiana de los LFE sobre HT-29

[mg/mL]	Liofilizados de factores extracelulares de:				Control
	<i>L. casei</i> ** (nm)	<i>L. plantarum</i> ** (nm)	<i>L. acidophilus</i> * (nm)	<i>B. longum</i> ** (nm)	
430	0.08	0.07	0.07	0.07	0.36
215	0.06	0.06	0.07	0.07	
107	0.06	0.06	0.07	0.07	
53	0.06	0.06	0.07	0.07	
26	0.07	0.07	0.06	0.07	
13	0.10	0.11	0.078	0.09	
7	0.27	0.21	0.19	0.39	
3.5	0.36	0.45	0.29	0.28	

*Diferencia significativa contra el grupo control

** Diferencia significativa contra el grupo control, pero igualdad entre tratamientos

Entre LFE de las cuatro cepas probióticas se observa que en las diluciones de 430mg/mL a 26 mg/mL hay semejanza en las lecturas de absorbancia. En las diluciones de 13mg/mL a 3 mg/mL, LFE de *L. acidophilus* tuvieron un comportamiento distinto, ya que se obtuvieron números más bajos, esto indica que a estas concentraciones hubo mayor inhibición del crecimiento de la línea celular HT-29. *L. acidophilus* tuvo diferencia significativa con las otras tres cepas, y las cuatros tuvieron diferencia significativa con el grupo control (células sin tratamiento).

Por otra parte, la Tabla 5 muestra los resultados del control negativo de proliferación celular, en el cual se utilizó doxorrubicina HCl a diferentes concentraciones. Los resultados mostraron una significativamente menor proliferación celular ($p=0.05$) en todas las concentraciones comparado con el grupo control. En la primera dilución (1mg/mL) el valor de absorbancia fue de 0.12 nm y el de la última dilución (0.007mg/mL) obtuvo también 0.12 nm. Las otras diluciones mostraron valores de absorbancia entre 0.09 y 0.11 nm. En contraste el valor de absorbancia del grupo control fue de 0.36 nm.

Tabla 5.
Actividad biológica de Doxorrubicina HCl sobre HT-29

Diluciones [mg/mL]	Doxorrubicina HCl * (nm)	Control (nm)
1.00	0.12	0.36
0.50	0.09	
0.25	0.09	
0.125	0.09	
0.0625	0.11	
0.03125	0.13	
0.015	0.11	
0.007	0.12	

* Diferencia significativa contra el grupo control

La Fig. 15 muestra la actividad biológica de LFE de las cuatro cepas probióticas frente a la línea celular HT-29, asimismo el grupo control positivo y negativo para la proliferación celular. Se observa que en las diluciones de 430mg/mL a 13mg/mL de *L. acidophilus*, *B. longum* y *L. casei* tuvieron una proliferación menor al grupo control negativo (doxorrubicina HCl); *L. plantarum* sólo de la dilución 430 mg/mL a la 26mg/mL.

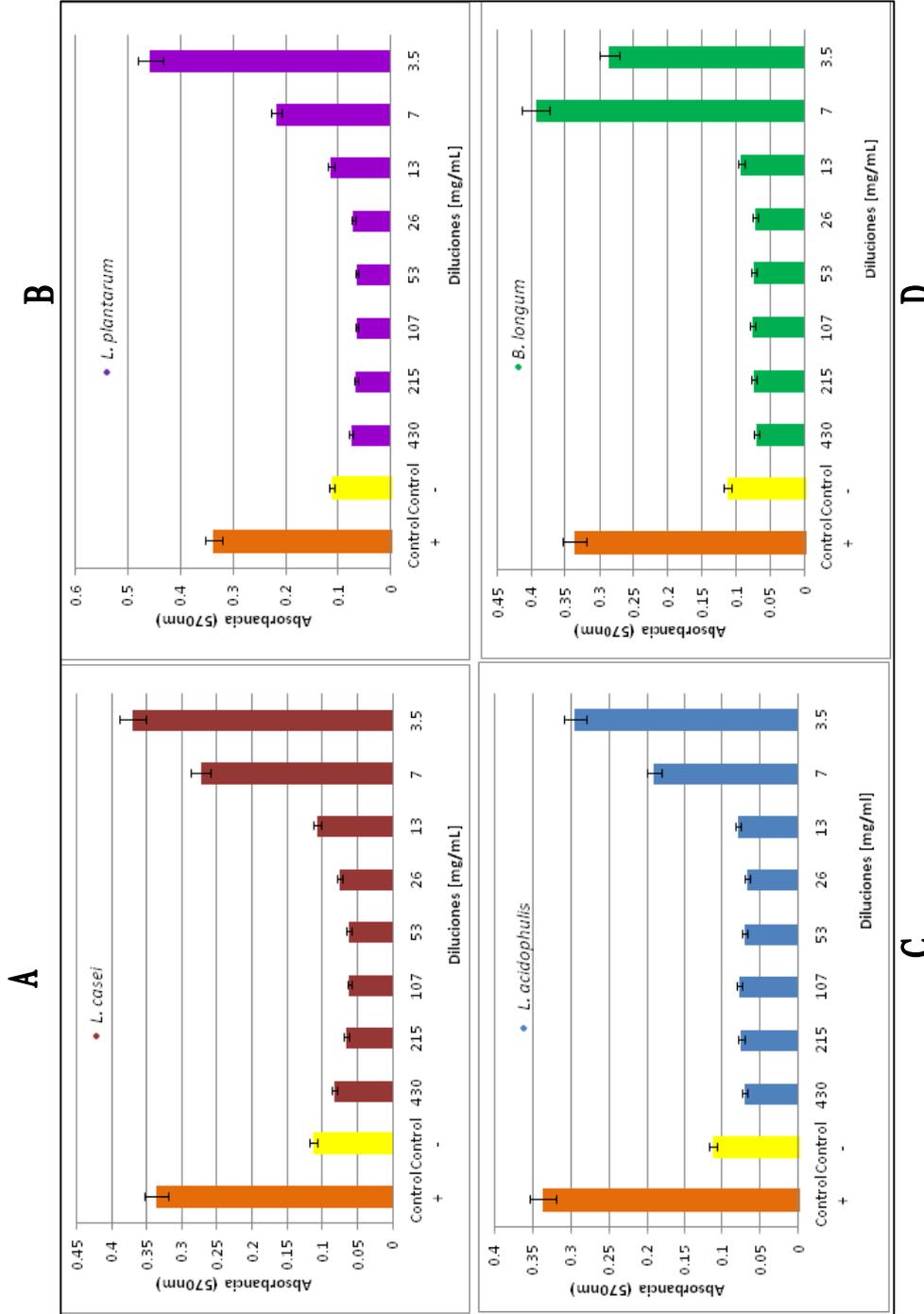


Fig. 15. Actividad biológica de LFE frente a HI-29. Lecturas de absorbancia a 570 nm de LFE frente a la línea celular HI-29, y de grupo control positivo de proliferación celular (naranja) y grupo control negativo (amarillo). A) Lecturas de LFE de *L. casei*. B) Lecturas de LFE de *L. plantarum*. C) Lecturas de LFE de *L. acidophilus*. D)

En la Fig. 16 se muestran las microplacas con la línea celular HT-29 después del método del MTT. En la figura A se observa el grupo control positivo para proliferación celular, la coloración oscura muestra que las células tienen metabolismo, asimismo se observa que en las últimas concentraciones para algunos FE de las cepas probióticas el efecto fue menor y se observa una coloración tenue; donde no hay color se describe como células no viables. En la figura B, la última columna es el grupo control negativo para proliferación (doxorubicina HCL) en el cual no hay coloración oscura.

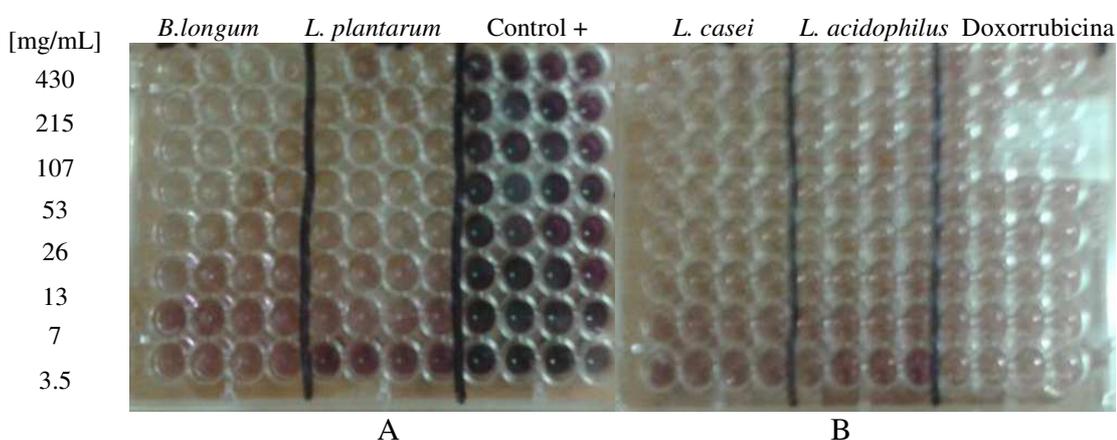


Fig. 16. Imágenes del bioensayo de los LFE y grupo control positivo y negativo contra HT-29. Fotografías tomadas al final de cada bioensayo; puede observarse la coloración oscura de viabilidad en el grupo control + y en las últimas dos concentraciones de los LFE.

Para *L. acidophilus* las concentraciones de 430 mg/mL a 7mg/mL son estadísticamente iguales y la que obtuvo diferencia significativa es 3.5mg/mL. Para *B. longum*, *L. plantarum* y *L. casei* las concentraciones de 430mg/mL a 13 mg/mL son semejantes y las de 7mg/mL y 3.5mg/mL tienen diferencia significativa entre ellas mismas y con las demás diluciones.

6.4.1 Dosis letal media (DL₅₀)

En la Tabla 6 se describe la DL₅₀ de los FE de las cepas probióticas y de Doxorubicina HCl. En la DL₅₀, *L. acidophilus* fue el LFE que presentó la menor cantidad (0.294 mg/mL) para inhibir el crecimiento de la línea celular HT-29, siguiendo *B. longum* (1.206 mg/mL), *L. plantarum* (2.973 mg/mL) y *L. casei* (5.132 mg/mL) fue quien requiere de mayor cantidad. En el caso de la doxorubicina HCl se requieren cantidades muy bajas para alcanzar la DL₅₀ (<0.0001mg/mL) (Anexo II).

Tabla 6.
DL₅₀ de los LFE frente a la línea celular HT-29

Tratamientos	DL ₅₀
<i>Lactobacillus casei</i>	5.132
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.973
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.294
<i>Bifidobacterium longum</i>	1.206
Doxorrubicina HCl	<0.0001

6.5 Prueba de citotoxicidad

Se realizó la prueba de citotoxicidad de los LFE de las cepas probióticas utilizando leucocitos; asimismo, también se hizo la prueba con los LFE + leucocitos + concavalina A (ConA); ésta como mitógeno. El grupo control fue medio de cultivo AIM-V + leucocitos; y, medio de cultivo AIM-V + leucocitos + ConA. En la Fig. 17 se muestra los resultados. Para *L. casei* las concentraciones de 215 mg/mL y 13mg/mL a 3.5mg/mL tuvieron mayor proliferación que *L. casei* + ConA pero ninguna dilución fue mayor al grupo control. *L. plantarum* en todas sus

concentraciones fue mayor la proliferación que *L. plantarum* + ConA, y en las diluciones de 215mg/mL, 107mg/mL y 7mg/mL fue mayor la proliferación que el grupo control. En las concentraciones de 13mg/mL a 3.5mg/mL los LFE de *L. acidophilus* tuvieron mayor proliferación que *L. acidophilus* + ConA y en las de 13mg/mL y 7mg/mL los resultados fueron mayores que el grupo control. En el caso de *B. longum* siempre fue mayor la proliferación que *B. longum* + ConA, pero ninguna fue mayor que el grupo control, en las concentraciones de 26mg/mL y 53mg/mL hubo menor proliferación.

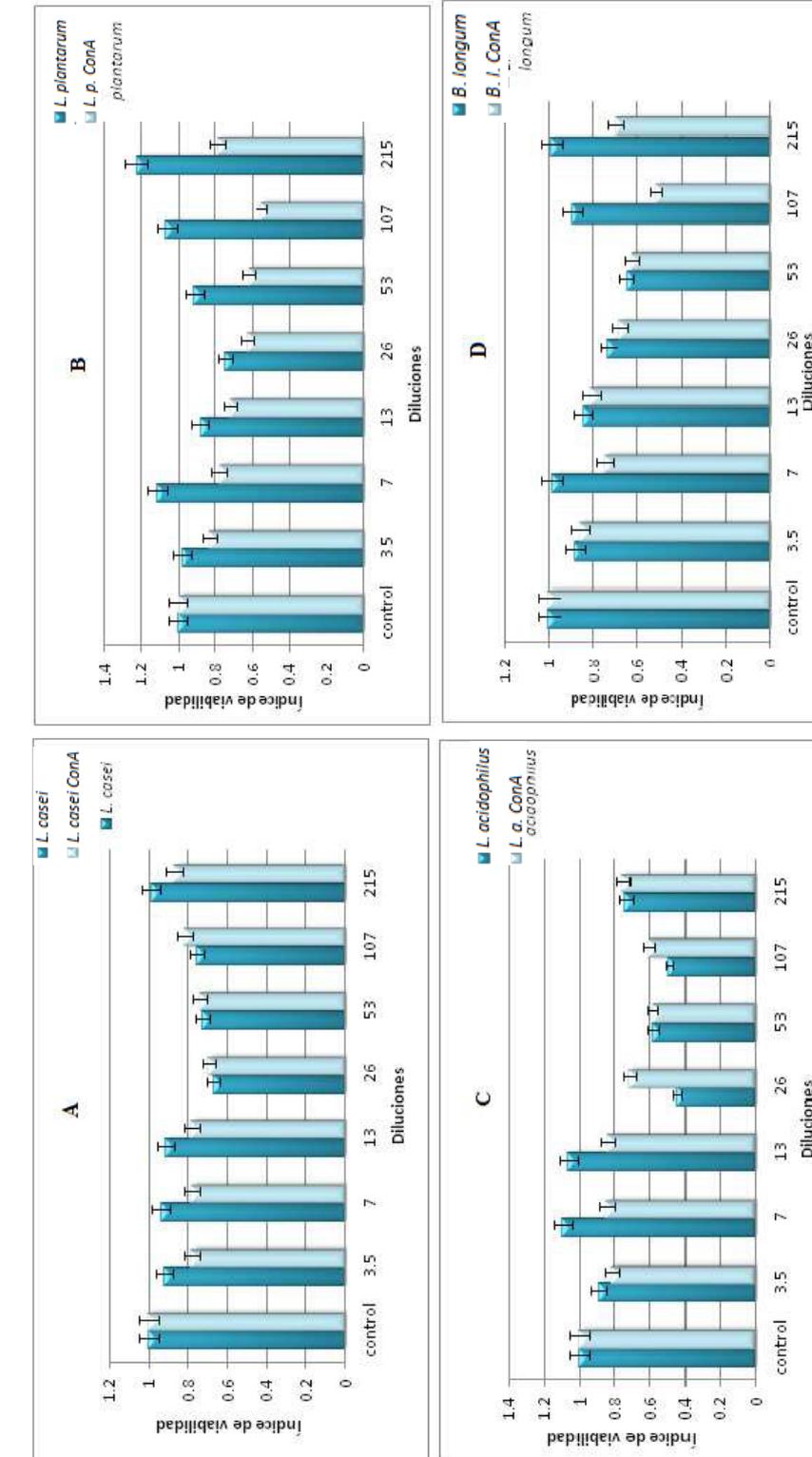


Fig. 17. Efecto de LFE de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* sobre la proliferación *in vitro* de células mononucleares de la de sangre periférica humana. Se muestran los tratamientos de los LFE de las cepas probióticas (oscuro) y LFE + Con A (claro). El grupo control fue sólo medio de cultivo y leucocitos. A) LFE de *L. casei* + ConA. B) LFE de *L. plantarum* y *L. plantarum* + ConA. C) LFE de *L. acidophilus* y *L. acidophilus* + ConA. D) LFE de *B. longum* y *B. longum* + ConA.

7. DISCUSIÓN

En el recuento bacteriano en placa, Fig. 13, *L. acidophilus* fue la cepa que mostró un mayor número de UFCs (652.66×10^9) seguido por *L. plantarum* (89.33×10^9), *B. longum* (59×10^9) y *L. casei* con el menor número (35.33×10^9); en la cinética de crecimiento *L. acidophilus* fue la cepa que en menor tiempo llegó a su fase estacionaria, el resultado para esta cepa podría relacionarse puesto que rápido tuvieron crecimiento exponencial y en el recuento en placa recuperaron su viabilidad mayor a las otras cepas probióticas.

El aspecto de los LFE de las cepas probióticas, además del rango de pH a nivel entre 4 y 5 y color entre amarillo, rojo, café y marrón, presentaban olor fuerte y durante varios minutos a temperatura ambiente se convertían a líquido aceitoso y su color cambiaba a más oscuro, véase tabla 3. Con estas características se sugiere que la composición de los LFE es mayor en ácidos grasos insaturados.

En la actividad biológica de los LFE, *L. acidophilus* tuvo diferencia significativa ($p=0.05$) con las cepas *B. longum*, *L. plantarum* y *L. casei*, tabla 4. En *L. acidophilus* las diluciones de 430 mg/mL a 13mg/mL fueron estadísticamente iguales y sólo la de 3.5mg/mL tuvo diferencia significativa. En el caso de *B. longum*, *L. plantarum* y *L. casei* las concentraciones de 430mg/mL a 13 mg/mL son semejantes y las de 7mg/mL y 3.5mg/mL tienen diferencia significativa entre ellas mismas y contra las demás diluciones. En *B. longum* la dilución de 7mg/mL no tuvo inhibición de la línea celular HT-29 y en la de 3.5mg/mL si se presenta inhibición, semejante a *L. acidophilus*, Fig. 15. *L. plantarum* y *L. casei* no obtuvieron inhibición en la dilución de 3.5mg/mL.

Asimismo se observa que en las diluciones de 430mg/mL a 13mg/mL de *L. acidophilus*, *B. longum* y *L. casei* tuvieron una proliferación menor al grupo

control negativo (doxorubicina HCl), excepto *L.plantarum* en la dilución de 13mg/mL, tablas 4 y 5.

En las DL₅₀ los LFE de *L. acidophilus* remarcan que se requiere menor cantidad para inhibir el crecimiento de la línea celular HT-29 (0.294 mg/mL), le siguen los LFE de *B. longum* (1.206 mg/mL), *L. plantarum* (2.973 mg/mL) y *L. casei* (5.132 mg/mL). La doxorubicina HCl requiere menor cantidad (<0.0001 mg/mL), tabla 6. Estos resultados respaldan los datos que se obtuvieron en la actividad biológica puesto que los LFE de *L. acidophilus* tienen mayor inhibición de la línea celular HT-29 aún con menor concentración.

Baricault *et al.* (1995) estudiaron el efecto de las leches fermentadas sobre el crecimiento celular del cáncer de colon y encontraron que el 10-50 % de las células HT-29 mostró una disminución en el crecimiento. Análisis posteriores revelaron que las actividades específicas del marcador específico para la diferenciación de células HT-29 tales como los péptidos dipeptidil se incrementaron. Los autores sugirieron que las células tumorales entraron en un proceso de diferenciación que conduce a crecimientos inferiores.

Lidbeck *et al.* (1991) demostraron una baja concentración de ácidos biliares secundarios en heces por la administración de leches fermentadas suplementadas con *L. acidophilus*. Asimismo en 1992 hicieron un importante estudio mostró que la mutagenicidad fecal se redujo por $\approx 28\%$ después de que el consumo de tanto carne frita y leche fermentada de *L. acidophilus*, en oposición a la leche fermentada con *Lactococcus* en los seres humanos.

Surono y Hosono (1996) y Nadathur *et al.* (1995) describen que la etapa de crecimiento de las bacterias también parece jugar un papel importante en antimutagenicidad. En la fase de crecimiento lineal, un profundo aumento en la actividad anti-mutagénica se produce, alcanzando un nivel máximo de actividad bacteriana que luego disminuye en la fase de crecimiento estacionario. Además

del número y la fase de crecimiento de las bacterias, es evidente que otros factores influyen en la anti-mutagenicidad.

Fotiadis *et al.* (2008) y Biasco *et al.* (1991) demostraron que el crecimiento de bacterias que liberan enzimas carcinogénicas, se inhibe por bajo pH y probióticos (*L. acidophilus* y *B. bifidum*), reportaron pH bajo en heces fecales con baja proliferación de colonias en criptas así como la reducción de la formación de los ácidos biliares secundarios.

Kulkarni y Reddy (1994), con una alimentación para ratas con *B. longum* reportaron una inhibición en formación de cripta aberrante (FCA) en 50% de los animales tratados. Challa *et al.* (1997) observaron una reducción del 23% en total colonización de FCA y 28% en total de cripta aberrante (AC) en ratas con una dieta suplementada con 0.5% de *B. longum* (1×10^8 células viables/g de alimento).

Singh *et al.* (1997) evaluaron el efecto de *B. longum* en la carcinogénesis de colon utilizando ratas macho destetadas F344. Los resultados de su estudio de 40 semanas demostraron que la administración dietética de cultivos liofilizados de *B. longum* resultó en una supresión de la incidencia de tumores de colon y el número de tumores y también redujo el volumen del tumor.

En su revisión sobre la prevención de cáncer de colon por probióticos, Brady *et al.* (2000) recogen un total de 24 observaciones sobre probióticos y tumores de colon, que describen la reducción por derivados lácteos fermentados por bacterias del ácido láctico, probando una relación inversa entre el consumo de probióticos y aparición de AC o el desarrollo de tumores en el colon.

Rowland (2008) encontró una baja incidencia de lesiones precancerosas (FCA) en el colon con la administración de probióticos a ratas.

Reddy *et al.* (1997) reportaron que un mayor crecimiento de bifidobacterias en el colon, lo cual puede resultar en la inhibición del desarrollo de FCA y multiplicidad de las criptas, lo cual fue atribuido a la reducción de pH por colonias de microorganismos que fueron responsables de inhibir el crecimiento de *E. coli* y *Clostridium*.

Al igual que los resultados de los trabajos antes descritos, nuestros resultados demostraron que las cepas de *L. acidophilus* y *B. longum* en los experimentos de los LFE fueron las que tuvieron mayor inhibición de la línea celular HT-29, y se requiere menor cantidad (0.294 mg/mL y 1.206 mg/mL respectivamente) en comparación con las cepas de *L. casei* (5.132mg/mL) y *L. plantarum* (2.973mg/mL). De hecho, *L. acidophilus* tuvo un efecto de inhibición de la línea celular HT-29 significativamente mayor ($p=0.05$) comparado con *B. longum*.

Los resultados obtenidos fueron similares a los de Baricault *et al.* (1995) puesto que hubo una inhibición de crecimiento de la línea celular HT-29, aunque con mayor porcentaje, a partir de 60% con los LFE de las cuatro cepas de probióticos utilizadas. Asimismo se respalda que los LFE de *L. acidophilus* y *B. longum* obtuvieron mejores resultados en comparación con Lidbeck *et al.* (1991), Singh *et al.* (1997), Kulkarni y Reddy (1994); Fotiadis *et al.* (2008) y Biasco *et al.* (1991).

En la prueba de citotoxicidad de los FE de *L. acidophilus* las concentraciones de 13mg/mL a 3.5mg/mL tuvieron mayor proliferación que el tratamiento de LFE+ConA y en las de 13mg/mL y 7mg/mL los resultados fueron mayores que el grupo control. En *L. casei* las concentraciones de 215 mg/mL y 13mg/mL a 3.5mg/mL hubo mayor proliferación que LFE+ConA pero ninguna mayor al grupo control. *L. plantarum* en todas sus concentraciones fue mayor la proliferación que LFE+ConA y en las diluciones de 215mg/mL, 107mg/mL y 7mg/mL fue mayor la proliferación que el grupo control. En el caso de *B. longum* siempre fue mayor la proliferación que LFE+ConA, pero ninguna fue mayor que

el grupo control, en las concentraciones de 26mg/mL y 53mg/mL hubo menor proliferación, Fig. 17.

Mateos (2002) ha relacionado el consumo de ciertos alimentos prebióticos, que contienen bifidobacterias y otras cepas de bacterias benéficas son estimuladoras de la síntesis de IgA.

Bujalance *et al.* (2007) en un estudio donde empleó *Lactobacillus plantarum* como inmunomodulador; ya que este estimuló significativamente a los esplenocitos en respuesta a la concavalina A y al mitógeno de las células T. Pirkka *et al.* (1999) observaron que *L. acidophilus* estimularon la proliferación basal *ex vivo* de linfocitos esplénicos de ratón. Matsuzaki *et al.* (2007) sugieren que algunas bacterias probióticas tienen potencial para aumentar o modificar la función inmune del huésped a través de la regulación de las células inmunes del huésped.

Estudios sobre las propiedades desmutagénicas de probióticos sugirieron que las sustancias desmutagénicas pueden residir en la envoltura celular de la pared celular bacteriana. Sekine *et al.* (1995) encontró en una preparación de la pared celular de *B. infantis*, tiene inhibición en la actividad del tumor en las células peritoneales de ratón de manera *in vitro*, mientras que Okawa *et al.* (1993) encontró en una preparación de la pared celular de *L. casei* (atenuada por calor) (LC9018) induce inmunidad contra la inducción de tumores en un estudio aleatorizado, controlado y comparativo con 223 pacientes con cáncer de cuello uterino en estadio III. Se encontró que los efectos antitumorales que se debe a la activación de macrófagos por LC9018.

Matsuzaki (1998) demostró que *L. casei* Shirota tiene efectos anti-tumorales y anti-metástasis de células tumorales transplantables, para suprimir la carcinogénesis inducida químicamente en los roedores y para inducir la producción de varias citoquinas, como el interferón- γ , IL-1 β y TNF- α que resultó

en la inhibición del crecimiento del tumor y el aumento de la supervivencia de los ratones portadores de tumores. Resultados similares han sido reportados por Lee *et al.* (2004) para las cepas de *L. acidophilus* SNUL, *L. casei* YIT9029 y *B. longum* HY8001. Sun *et al.* (2005) demostraron de manera *in vivo* que el peptidoglicano de una especie de *Lactobacillus* fue capaz de reducir el crecimiento de células de cáncer de colon CT26 en ratones BALB/c a través de un aumento en el nivel de la apoptosis. Curiosamente, el peptidoglicano no tuvo ningún efecto sobre la apoptosis de células tumorales *in vitro*, lo que implica que de forma *in vivo* el efecto anti-tumorigénicos pudo haber sido mediado por la respuesta inmune. Además de eso, los estudios recientes de Ghoneum *et al.* (2005) han demostrado que los probióticos pueden ser eficaces contra células Caco-2 de adenocarcinoma de colon; y Ghoneum y Gollapudi (2004) también lo demostraron contra una línea celular de cáncer de mama, lo que sugiere que las intervenciones terapéuticas probióticos puede no necesariamente se limita a los cánceres que afectan el tracto gastrointestinal sistema.

Los resultados que se obtuvieron en nuestro experimento con leucocitos, fue que los LFE de las cuatro cepas probióticas estimularon su proliferación, todas fueron mayor en comparación con el testigo de LFE+ConA ($p=0.05$), Fig. 17. Esto fue similar a lo reportado por Bujalance *et al.* (2007) y Pirkka *et al.* (1999) al estimular células del sistema inmune.

Fotiadis *et al.* (2008) y Wollowski *et al.* (2001) han escrito que el butirato inhibe la proliferación celular e incrementa la apoptosis de células transformadas pero produce efectos en contra de células normales. *Butyrivibrio fibrisolvens* MDT-1 produce altas cantidades de butirato. En la administración de MDT-1 a ratones con cáncer colorectal se ha encontrado que reduce ACF de manera significativa y disminuye la actividad de β -glucuronidasa y promueve la respuesta inmune, incrementa de las células natural killer (NK).

Clarke *et al.* (2011) examinaron el impacto de la creciente concentración de butirato intestinal con dieta de almidón butilado sobre el epitelio colónico de ratas tratadas con el azoximetano carcinógeno genotóxico (AOM). El aumento de la apoptosis fue marcada y proponen que la función pro-apoptótica de butirato juega un papel importante la reducción de la formación de tumor en ratas tratadas con AOM y que estos datos apoyan un papel protector potencial de butirato en el CRC.

Zhang *et al.* (2010) investigaron el mecanismo de la citotoxicidad de butirato en las células de cáncer de colon humano RKO. Sus resultados mostraron que el butirato indujo un fuerte efecto inhibitor del crecimiento contra las células RKO e indujo también la apoptosis en células RKO.

Roy *et al.* (2009) evaluaron el efecto de butirato y también en combinación con carnitine en células de cáncer de manera *in vitro*, examinaron proliferación y apoptosis, y encontraron que en combinación se inhibe la proliferación y se induce la apoptosis de la línea celular Caco-2.

Fung *et al.* (2011) identificaron proteínas implicadas en la apoptosis inducida por el butirato en las células HCT116. Demostraron que el butirato probablemente induce una respuesta de estrés celular en las células HCT116 que se caracterizan por la activación de p38 MAPK y una respuesta de estrés en retículo endoplasmático (ER). También reportaron, los procesos celulares adicionales alterados por butirato, como la biosíntesis del grupo hemo y la expresión desregulada de proteínas de la lámina nuclear, que pueden estar implicados en la respuesta apoptótica observada en estas líneas celulares.

Hay trabajos donde se muestran los efectos de SCFAs sobre líneas células de cáncer de colon, el butirato es el más estudiado. Los LFE de las cepas probióticas muy probablemente contienen algunos de estos SCFAs y pueden ser los responsables de la inhibición de proliferación de la línea celular HT-29 utilizada.

Asimismo, estos resultados proveen datos para realizar en un futuro análisis de ácidos grasos de los LFE, proteínas y realizar experimentos con diferentes azúcares para elucidar que compuestos específicos impactan en la inhibición del crecimiento; así como realizar también experimentos *in vivo*.

8. CONCLUSIONES

- Los liofilizados de los factores extracelulares de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* contienen compuestos de naturaleza lipídica, y muy probablemente son los responsables de la actividad biológica contra la línea celular HT-29 de cáncer de colon humano.
- Los LFE de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* inhiben el crecimiento de la línea celular HT-29.
- Los LFE de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* no tienen efecto citotóxico sobre linfocitos, e induce la proliferación de éstos.
- Los LFE de *L. acidophilus* tuvieron diferencia significativa con las otras cepas probióticas; mostraron mayor inhibición de la línea celular HT-29 de cáncer de colon humano y con menor cantidad.
- Los LFE de *L. acidophilus* y *B. longum* tuvieron mejores resultados que *L. casei* y *L. plantarum*.
- La concentración mínima inhibitoria media de los LFE de *L. casei* fue de 5.132 mg/mL, *L. plantarum* 2.973 mg/mL, *L. acidophilus* 0.294 mg/mL y *B. longum* 1.206 mg/mL.

9. PERSPECTIVAS

- Para ampliar el resultado de la interferencia microbiana de los LFE de las cepas probióticas un experimento *in vivo* confirmaría o pondría a discusión los resultados obtenidos en experimento *in vitro*.
- Por los resultados obtenidos en este trabajo se podrían realizar sinergias de cepas probióticas para observar el comportamiento que se generaría frente a líneas celulares de cáncer colorrectal.
- La composición de los LFE no está conocida completamente, por el aspecto está formado por ácidos grasos insaturados, con análisis de cromatografía de gases para obtener un perfil de ácidos grasos.
- Con el uso de microscopía de fuerza atómica (AFM) se pueden observar y obtener información de líneas celulares de cáncer después de la exposición de los LFE y demostrar que resultados hay con esta interacción microbiana.

10. LITERATURA CITADA

Artículos en Revistas

- Armstrong B. and R. Doll. 1975. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *International Journal of Cancer*; **15**:617-631.
- Arunachalam K. D. 1999. Role of *Bifidobacteria* in nutrition, medicine and technology. *Nutrition Research*; **19**: 1559-1597.
- Aso Y., H. Akaza, T. Kotake, T. Tsukamoto, K. Imai and S. Natio. 1995. Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. The BLP Study Group *European Urology*; **27**:104-109.
- Baricault L., G. Denariáz, J. J. Hourí, C. Bouley, C. Sapin and G. Trugnan. 1995. Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis*; **16**: 245-252.
- Barrón-González M.P., G. C. Serrano Vázquez, L. Villareal-Treviño, J. A. Verduzco Martínez, M. R. Morales Vallarta y B. D. Mata Cárdenas. 2008. Inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* por acción de probióticos. *Ciencias UANL*; **11**:235-290.
- Biasco G., G. M. Paganelli, G. Brandi, S. Brillanti, F. Lami, C. Callegari and G. Gizzi. 1991. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on rectal cell kinetics. *Italian Journal of Gastroenterology*; **23**: 142.

- Biavati B., N. Vascovo, S. Torreani and V. Bottazzi. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, psicology and applications. *Annual Microbiology*; **50**:117-131.
- Brady L. J., D. D. Gallaher and F. F. Busta. 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *Journal of Nutrition*; **130**:410-414.
- Bruce W. R. 1987. Recent hypotheses for the origin of colon cancer. *Cancer Research*; **47**: 4237-4242.
- Burns A. J. and I. R. Rowland. 2000. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*; **1**: 1324.
- Casas I. and W. J. Dobrogosz. 2000. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in human and animals. *Microbial Ecology in Health and Disease*; **12**:247-285.
- Challa A., D. R. Rao, C. B. Chawan and L. Shackelford. 1997. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*; **18**: 517-521.
- Chung H. S., Y. B. Kim, S. L. Chun and G. E. Ji. 1999. Screening and selection of acid and bile resistan bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*; **47**:25-32.
- Clarke J. M., G. P. Young, D. L. Topping , A. R. Bird, L. Cobiac, B. L. Scherer, J. G. Winkler and T. J. Lockett. 2011. Butyrate delivered by butyrylated starch increases distal colonic epithelial apoptosis in carcinogen-treated rats. *Oxford Journals Life Sciences & Medicine Carcinogenesis*; **33**: 197-202.

- De La Cochetière M. F. T., P. Durand, A. Lepage, J. P. Burreille and J. Dore. 2005. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *Journal of Clinical Microbiology*; **43**:5588-5592.
- Dunne C., L. Murphy, S. Flynn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morrissey, G. Thornton, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E.M.M. Quigley, G.C. O'Sullivan, F. Shanahan and J.K. Collins. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antoine van Leewenhoek*; **76**:279-292.
- El-Nezami H., H. Mykkänen, P. Kankaanpää, S. Salminen and J. Ahokas. 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Probionibacterium* strains to remove aflatoxin B₁ from chicken duodenum. *Journal of Food Protection*; **63**:549-552.
- FAO/OMS Consulta de Expertos sobre Evaluación de las Propiedades Saludables Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico, 1-4 de octubre de 2001.
- Forman M. R., S. D. Hursting, A. Umar and J. C. Barret. 2004. Nutrition and cancer prevention. *Annual Revision of Nutrition*; **24**:223-54.
- Fotiadis C. I., C. N. Stoidis, B. G. Spyropoulos and E. D. Zografos. 2008. Role of probiotics, prebiotics and symbiotic in chemoprevention for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*; **14(42)**: 6453-6457.
- Freitas M. and C. Cayuela. 2000. Microbial modulation of host intestinal glycosylation patterns. *Microbial Ecology in Health and Disease*; **12**: 165-178.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*; **66**:365-378.

- Fung K. Y. C., G. V. Brierley, S. Henderson, P. Hoffmann, S. R. McColl, T. Lockett, R. Head and L. Cosgrove. 2011. Butyrate-Induced Apoptosis in HCT116 Colorectal Cancer Cells Includes Induction of a Cell Stress Response. *Journal Proteome Research*; **10**(4): 1860–1869.
- Ghoneum M., J. Hamilton, J. Brown and S. Gollapudi. 2005. Human squamous cell carcinoma of the tongue and colon undergoes apoptosis upon phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, in vitro. *Anticancer Research*; **25**:981–989.
- Ghoneum M. and S. Gollapudi. 2004. Induction of apoptosis in breast cancer cells by *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, in vitro. *Anticancer Research*; **24**:1455–1463.
- Gibson G. R. and M. B. Roberfroi. 1995. Dietary modulation of the colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*; **125**:1401-1412.
- Gomes M. P. A. and F. X. Malcata. 1999. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*; **10**: 139-157.
- Gomez A. and F. Malacata. 1999. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. *Trend Food Science Technology*; **10**:139-157.
- Gupta V. and R. Garg. 2009. Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*; **27**: 202-209.

- Hamilton-Miller J. M. T., G. R. Gibson and W. Bruck. 2003. Some insight into the derivation and early uses of the word “probiotic”. *British Journal of Nutrition*; **90**: 845.
- Hertzler S. R. and S. M. Clancy. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*; **103**: 582-587.
- Holzapel W. H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger and J. H. J. Huis in't Veld. 1998. Overview of gut flora & probiotics. *International Journal of Food Microbiology*; **41**: 85-101.
- Hosada M., H. Hashimoto, D. He, H. Morita and A. Hosono. 1996. Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on faecal mutagenicity and microflora in human intestine. *Journal of Dairy Science*; **79**:745-749.
- Jemal A, T. Murray, E. Ward, A. Samuels, R. C. Tiwari and A. Chafoor. 2005. Cancer Statistics. *CA: a Cancer Journal Clinical*; **55**:10-30.
- Kailasapathy K. and J. Chin. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology and Cell Biology*; **78**: 80-88.
- Kleessen B., E. Bezirtzoglou and J. Mättö. 2000. Cultures-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease*; **12**:53-63.
- Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte and G. Reuter. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*; **41**:103-125.

- Kó•ová J., A. Španová and B. Rittich. 2006. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and species-specific PCR for identification of *Bifidobacterium* species. *Systematic and Applied Microbiology*; **29**:36-44.
- Kolars J. C., M. D. Levitt, M. Aouji and D. A. Savaiano. 1984. Yogurt: an autodigesting source of lactose. *The New England Journal of Medicine*; **310**:1-3.
- Kulkarni N. and B. S. Reddy. 1994. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane induced aberrant crypt foci formation and faecal bacterial β -glucuronidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; **207**: 278283.
- Lee J. W., J. G. Shin, E. H. Kim, H. E. Kang, I. B. Yim, J. Y. Kim, H. G. Joo and H. J. Woo. 2004. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *Journal of Veterinary Science*; **5**:41–48.
- Ley R. E., D. A. Peterson and J. L. Gordon. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*; **124**:837-848.
- Lidbeck A., U. Geltner-Allinger, L. Oehage, B. Brismar, J. Gustafson, J. J. Rafter and C.E. Nord. 1991. Impact of *L. acidophilus* supplements on the faecal microflora and soluble faecal acids in colon cancer patients. *Microbial Ecology in Health and Disease*; **4**:81-88.
- Liévin-Le Moal V. and A. L. Servin. 2006. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*; **19**:315-337.
- Lilly, D. M and R. H. Stillwell. 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science*; **147**:747-748.

- Linder J. D., C. Canchaya, Z. Zhang, E. Neviani, G. F. Fitzgerald, D. V. Sinderen and M. Ventura. 2007. Exploring *Bifidobacterium* genomes: The molecular basis of stress response. *International Journal of Food Microbiology*; **120**:13-24.
- Liong M. T. 2008. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and *in vivo* evidence. *International Journal of Molecular Sciences*; **9**: 854-863.
- Lopez Brea M. and D. Domingo. 2007. Antibiotic therapy with probiotics. *Revista Española de Quimioterapia*; **20**:170-18.
- Lourens-Hattingh A. y C. B. Viljeon. 2001. Yoghurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*; **11**: 1-17.
- Macfarlane S., M. J. Hopkins y G. T. Macfarlane. 2000. Bacterial growth and metabolism on surfaces in the large intestine. *Microbial Ecology in Health and Disease*; **12**:64-72.
- Mackay A. D., M. B. Taylor, C. C. Kibbler and J. M. Hamilton-Miller. 1999. *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clinical Microbiology Infection*; **5**: 290-292.
- Martínez M. J. 2001. Agentes probióticos y patología intestinal. *Anales Españoles de Pediatría*; **54**: 15-16.
- Matthew A. 2012. A Gastroenterologist's Guide to Probiotics. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **10(9)**:960-968, DOI: 10.1016/j.cgh.2012.03.024)

- Matsumoto M. and Y. Benno. 2004. Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutation Research*; **568**:147-153.
- Matsuzaki T. 1998. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *International Journal of Food Microbiology*; **41**:133–140.
- Mennickent S. y K. Green. 2009. Los probióticos y su utilidad terapéutica. *Ciencia Ahora*; **24**:31-38.
- Oatley J. T., M. D. Rarick, G. E. Ji and J. E. Linz. 2000. Binding of aflatoxin B₁ to bifidobacteria *in vitro*. *Journal of Food Protection*; **63**:1133-1136.
- Ouwehand C. A., V. P. Kirjavainen, C. Shortt and S. Salminen. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*; **9**:42-52.
- Rasic J. L and J. A. Kurmann. 1983. Bifidobacteria and their Role. Microbiological, Nutritional-Physiological, Medical and Technological Aspects and Bibliography. *Experientia Supplied*; **39**: 1-295.
- Rastall R. A. 2004. Bacteria in the gut; friends and foes and how to alter the balance. *Journal Nutritional*; **134**:2022S-2026S.
- Rautio M., H. Jousimies-Somer and H. Kauma. 1999. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus strain GG*. *Clinical Infectious Diseases*; **28**:1159-1160
- Reddy B. S, R. Hamid and C.V. Rao. 1997. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis*; **18**: 1371-1374.

- Reid G., J. Jass, M. T. Selbusky y J. K. McCornick. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*; **16**:658-672
- Rowland I. 2008. Probiotics and cancer – from *in vitro* to human studies. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*; **3**:165-168.
- Roy M. J., S. Dionne, G. Marx, I. Qureshi, D. Sarma, E. Levy and E. G. Seidman. 2009. *In vitro* studies on the inhibition of colon cancer by butyrate and carnitine. *Nutrition*; **25**: 1193-1201.
- Sakata S., C. S. Ryu, M. Kitachara, M. sakamoto, H. Hayashi, M. Fukumaya and Y. Benno. 2006. Characterization of the genus *Bifidobacterium* by automated ribotyping and 16S rRNA gene sequences. *Microbiology and Immunology*; **50**:1-10.
- Salminen S., E. Isolauri and E. Salminen. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier; successful strains and future challenges. *Antoine van Leewenhoek*; **70**:347-358.
- Salminen S. 1996. Uniqueness of probióticos strains. *News Letter*; **5**:16-18.
- Saxelin M., H. Rautelin, S. Salminen and P. H. Mäkelä. 1996. The safety of commercial products with viable *Lactobacillus* strains. *Infectious Diseases in Clinical Practice*; **5**: 331-335.
- Seksik P., L. Rigottier-Gois, G. Gramet, M. Sutren, P. Pochart, P. Marteau, R. Jian and J. Dore. 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohns disease of the colon. *International Journal in Gastroenterology*; **52**: 237-242.

- Singh J., A. Rivenson, M. Tomita, S. Shimamura, N. Ishibashi and B. S. Reddy. 1997. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*; **18**: 833–841.
- Singh V., K. Singh, S. Amdekar, D. D. Singh, P. Tripathi, G. L. Sharma y H. Yadav. 2009. Innate and specific gut-associated immunity and microbial interference. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*; **55**: 6-12.
- Sreefumar O. and A. Hosono. 2000. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and faecal enzymes of rats and the *in vitro* inhibition of *Escherichia coli* coculture. *Journal Dairy Science*; **83**:931-939.
- Sun J., Y. H. Shi, G. W. Le and X. Y. Ma. 2005. Distinct immune response induced by peptidoglycan derived from *Lactobacillus* sp. *World Journal of Gastroenterology*; **11**:6330–6337.
- Tannock G. W., K. Munro, H. J. Harmsen, G. W. Welling, J. Smart and P. K. Gopal. 2000. Analysis of fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Applied and Environmental Microbiology*; **66**: 2578-2588.
- Tannock G. W. 1999. Analysis of the intestinal microflora: A resistance. *Antoine van Leeuwenhoek*; **76**:265-278.
- Tannock G. W. 2004. A special fondness for Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*; **70**:3189-3194.
- Valsiljevic T. y N. P. Shah. 2008. Probiotics from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*; **18**: 714-728.

Willett W. C. 2001. Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiology Biomarkers Preventive*; **10**:3-8.

Wong, J. M., R. de Souza, C. W. Kendall, A. Emam and D. J. Jenkins. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*; **40**:235-243.

Woodmansey E. J., M. E. McMurdo, G. T. Macfarlane and S. Macfarlane. 2004. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Applied Environmental Microbiology*; **70**: 6113-6122.

Zhang Y., L. Zhou, Y. Li, B. Yin, W. Chun, L. Yu, Y. Xin, H. Ying, S. Li, H. Zheng and Y. X. Li. 2010. Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells. *Chemico-Biological Interactions*; **18**: 174–181.

Libros

Bujalance M. C. M. 2006. Modificación de la respuesta biológica por microorganismos probióticos en modelos de animals inmunocompetentes e inmunocomprometidos. Editorial de la Universidad de Granada. pp. 52.

Calderon Villa Ariel. 2011. Actividad biológica del liofilizado de factores difusibles de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus casei rhamnosus* cultivadas en diferentes fuentes de carbono sobre *Giardia lamblia*. 2011. Tesis de Licenciatura, FCB/UANL.

Dotan I. y L. Mayer. 2003. Intestinal immunity, p.43-59. En G.A. Hecht (ed.), *Microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cell*. ASM Press, Washington.

- Figuerola I., L. Gómez-Ruiz, M. García y A. Cruz-Guerrero. 2006. El beneficio de los probióticos. *Industria Alimentaria*. 22-27.
- García Cobos Alejandra 2010. Actividad biológica de los liofilizados del medio condicionado con *Bifidobacterium longum* y con *Lactobacillus casei* sobre *Salmonella spp.* *Serratia marcescens* y *Enterobacter cloacae*. Tesis de Licenciatura, FCB/UANL-2011.
- García-Garibay M. 1996. Leches fermentadas como vehículos de probióticos.
- Geier M. S., R. N. Butler and G. S. Howarth. 2006. Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer? Hampl JS, DiSilvestro RA (ed.). *Perspectives in nutrition*. 6.^a edition.
- Hertzler S. 1996. Probiotics and prebiotics and human health. En: Wardlaw GM,
- Keseel J. and H. J. Klupsch. 1984. Method of producing kefir. German Federal
- Keshav S. 2004. Paneth cells in innate immunity and intestinal inflammation, p.171-196. En S.H.E. Kaufmann, R. Medzhitov S. Gordon (eds). *The innate immune response to infection*. ASM Press, Washington.
- Madigan M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2004. Brock. *Biología de los microorganismos*. Pearson Educación.
- Mateos J. A. Bacterias y salud. *Jornadas de Alimentos Funcionales*. 2002. Centre I nnovació. Fundació Bosch i Gimpera. Universidad. de Barcelona.
- Moreau M. C. and V. Gaboriau-Routhiau. 2000. Influence of resident intestinal microflora on the development and functions of the intestinal-associated lymphoid tissue, p.69-114. En R. Fuller y G. Perdígón (eds.), *Probiotics 3*:

immunomodulation by the gut microflora and probiotics. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Ontiveros L. H. 2011. Actividad biológica de factores difusibles de probióticos (FDP) sobre *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis* bajo condiciones axénicas *in vitro*. Tesis de Doctorado FCB UANL.

Prescott L. M., J. P. Harley y D. A. Klein. 2005. Microbiology (6th ed). McGraw-Hill, Boston.

Puertollano E., M. A. Puertollano, L. Cruz Chamorro, G. Alvarez de Cienfuegos y M. A de Pablo. 2005. Acción de los concentrados proteicos de *Lactobacillus plantarum* sobre una línea leucémica humana. Universidad de Jaén. Área de microbiología, 23071.

Ruiz-Bravo, A., M. Jiménez-Valera, M. M. López y A. Sampedro. 1992. Fundamentos de biología e inmunología tumoral. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Granada, Granada.

Salminen S., M. A. Deighton, Y. Benno and S. L. Gorbach. 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. En Lactic acid bacteria 2nd edition (Salminen S. Y von Wright, eds.) Marcel Dekker, Inc., New York. Pp. 211-253.

Saloff-Coste C. J. 1997. Beneficios de las leches fermentadas y de los probióticos sobre la salud, pp. 6-10.

Sidhu S., J. S. Deep, R. C. Sobti, V. L. Sharma and H. Thakur. 2010. Methylation pattern of MGMT gene in relation to age, smoking, drinking and dietary habits as epigenetic biomarker in prostate cancer patients. Genetic Engineering and Biotechnology Journal, 2010: GEBJ.

- Tannock G. W. 1995. Normal Microflora: An Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body. Chapman and Hall.
- Turner J. R. 2003. Functional morphology of the intestinal mucosa: from crypts to tips, p.1-22. En G.A. Hecht (ed.), Microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cell. ASM Press, Washington.
- Walker R. and M. Buckley. 2006. Probiotic microbes: the scientific bases. A report from the American Academy of Microbiology. ASM Press. Washington.
- Weisburger J. H. and E. L. Wynder. 1987. Etiology of colorectal cancer with emphasis on mechanism of action and prevention. In Important Advances in Oncology. Edited by De Vita VT(Jr.), Hellman S, Rosenberg SA. Philadelphia, PA: JB Lippincott, 197–220.
- Wollowski I, G. Rechkemmer and B. L. Pool-Zobel. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. American Journal. York. McGraw Hill; pp. 98-100.
- Zamora Herrera F.G., M. Morales Vallarta y M.P. Barrón González. 2007. Efecto del liofilizado del medio condicionado con el probiótico *Bifidobacterium sp.* Sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Material electrónico

CAM Therapies. Probiotics. Disponible en:
http://healthfinder.gov/search/?sort=date%253AD%253AL%253Ad1&output=xml&ie=UTF8&client=healthfinder&lr=lang_en&numgm=5&site=healthfinder&filter=0&q=probiotics

Euzéby, J.P. 2006. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponible en: <http://www.bacterio.net>

FAO. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>

NORMA Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5167303&fecha=16/11/2010.

Patel KP, Patel VJ, 2010. Probiotics, prebiotics and synbiotics. Disponible en: [<http://www.nhlmmcgym.com/indian-journal15.htm>]

www.yakult.com

Prebiotics, 2010. [http://170.107.206.70/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/pre_0326.shtml]

OMS, 2008. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

<http://www.cancer.org/espanol/cancer/colonyrecto/guiadetallada/cancer-colorrectal-treating-chemotherapy>

INEGI, 2011, www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/.../estadisticas/.../cancer0.do...

Cordero y Aristizábal, 2002: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/30098>

Parra y Aristizábal:
www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data.../EVALUACION%20.pdf

The absolute importance of probiotics, 2009.
[http://www.vitamintrader.com/articles/2006_12_probiotics.html]

<http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/tercero/integradotercero/ApFisiopSist/gastro/Fp tDiarrea.html>

<http://www.norel.es/pdf/3%20Use%20of%20additives%20as%20a%20preventive%20to ol%20agains%20infection%20diseases.pdf>

ANEXO I

Preparación de soluciones y medios de cultivo.

SOLUCIÓN	DESCRIPCIÓN
Ácido clorhídrico(0.1N)	Se afora hasta 50 mL con agua bidestilada desionizada 0.41 mL de HCl concentrado (12N).
Citrato férrico de amonio (1%)	Se disolvió 0.1g de citrato férrico de amonio en (CFA) 10 mL de agua bidestilada desionizada; y se mantuvo en refrigeración en un frasco ámbar a 4°C, hasta su empleo. Se esterilizó por medio de filtración.
Hidróxido de sodio (10N)	Se disolvieron 40g de hidróxido de sodio (NaOH) en 100mL de agua bidestilada desionizada.
Solución salina (0.85%)	Se disolvieron 0.85g de cloruro de sodio (NaCl) en 100mL de agua bidestilada desionizada y se ajustó a pH7.0. Se esterilizó en autoclave por 15 min a 15Lb de presión a 121°C. Se mantiene en refrigeración a 4°C, hasta su empleo.
Medio AIM-V	Medio para el cultivo de la línea celular HT-29, se adquirió en Aceso-Lab. GIBCO®.
Suero fetal bovino inactivado	Se adquirió en Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA. GIBCO®. Se inactivó colocándolo en un baño de calentamiento a 56°C durante 30 minutos. Se mantuvo en refrigeración a 4°C.
Ficoll-Paque	Se adquirió en Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA.
Concavalina A	Se adquirió en Biomedias INC. Se disolvieron 2.5mg de concavalina-A en 1mL de agua destilada. Se tomaron 96µL y se disolvieron en 10mL de AIM-V y posteriormente se filtró.
Tripsina-EDTA	Se adquirió en Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA.
DMSO	Se adquirió en Probiotek.
Azul de trypan	Se adquirió en Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA. Se preparó pesando 0.2g y se aforó a 100mL con agua destilada. Se esterilizó por filtración y se almacenó en refrigeración a 4°C .
Doxorrubicina HCl	Se adquirió de Zurich Pharma, en solución de 10 mg. Se le agregaron 10 mL de agua destilada y ésta fue la solución madre.
Bromuro de Tetrazolio (MTT)	El MTT se disolvió en PBS a una concentración de 5mg/mL a temperatura ambiente. La solución se esterilizó por filtración y se almacenó en refrigeración a 4°C.
MPT-agar	Se preparó con peptona de caseína, extracto de levadura, NaCl, glucosa, ácido ascórbico, L-cisteína, KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , citrato férrico de amonio y agar nutritivo.
MPT-caldo	Se preparó con peptona de caseína, extracto de levadura, NaCl, glucosa, ácido ascórbico, L-cisteína, KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ y citrato férrico de amonio.
CO ₂	Se adquirió en Praxair.

ANEXO II

Probit

L. casei

Probit Analysis

Data Information

		N of Cases
Valid		88
Rejected	Missing	2
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	8
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	8	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a Dosis	-.271	.162	-1.676	.094	-.589	.046
Intercept	.444	.634	.700	.484	-.190	1.078

a. PROBIT model: $PROBIT(p) = \text{Intercept} + BX$ (Covariates X are transformed using the base 2.718 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	3.332	86	1.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	27093.124	.	.	10.207	.	.
.020	9923.234	.	.	9.203	.	.
.030	5246.801	.	.	8.565	.	.
.040	3248.627	.	.	8.086	.	.
.050	2199.629	.	.	7.696	.	.
.060	1578.359	.	.	7.364	.	.
.070	1179.831	.	.	7.073	.	.
.080	909.194	.	.	6.813	.	.
.090	717.363	.	.	6.576	.	.
.100	576.770	.	.	6.357	.	.
.150	233.760	.	.	5.454	.	.
.200	114.035	.	.	4.737	.	.
.250	61.602	.	.	4.121	.	.
.300	35.435	.	.	3.568	.	.
.350	21.226	.	.	3.055	.	.
.400	13.053	.	.	2.569	.	.
.450	8.154	.	.	2.099	.	.
.500	5.132	.	.	1.636	.	.
.550	3.230	.	.	1.173	.	.
.600	2.018	.	.	.702	.	.
.650	1.241	.	.	.216	.	.
.700	.743	.	.	-.297	.	.
.750	.428	.	.	-.850	.	.
.800	.231	.	.	-1.465	.	.
.850	.113	.	.	-2.183	.	.
.900	.046	.	.	-3.086	.	.
.910	.037	.	.	-3.305	.	.
.920	.029	.	.	-3.542	.	.
.930	.022	.	.	-3.802	.	.
.940	.017	.	.	-4.093	.	.
.950	.012	.	.	-4.425	.	.
.960	.008	.	.	-4.815	.	.
.970	.005	.	.	-5.294	.	.
.980	.003	.	.	-5.932	.	.
.990	.001	.	.	-6.936	.	.

a. Logarithm base = 2.718.

L. plantarum

Probit Analysis

Data Information

		N of Cases
Valid		89
Rejected	Missing	2
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	7
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	7	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a Dosis	-.229	.163	-1.411	.158	-.548	.089
Intercept	.250	.635	.394	.694	-.385	.885

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 2.718 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	2.930	87	1.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	75749.400	.	.	11.235	.	.
.020	23071.059	.	.	10.046	.	.
.030	10851.364	.	.	9.292	.	.
.040	6152.566	.	.	8.725	.	.
.050	3877.984	.	.	8.263	.	.
.060	2618.131	.	.	7.870	.	.
.070	1855.221	.	.	7.526	.	.
.080	1362.858	.	.	7.217	.	.
.090	1029.516	.	.	6.937	.	.
.100	795.243	.	.	6.679	.	.
.150	273.047	.	.	5.610	.	.
.200	116.750	.	.	4.760	.	.
.250	56.325	.	.	4.031	.	.
.300	29.270	.	.	3.377	.	.
.350	15.959	.	.	2.770	.	.
.400	8.975	.	.	2.194	.	.
.450	5.143	.	.	1.638	.	.
.500	2.973	.	.	1.090	.	.
.550	1.719	.	.	.542	.	.
.600	.985	.	.	-.015	.	.
.650	.554	.	.	-.591	.	.
.700	.302	.	.	-1.197	.	.
.750	.157	.	.	-1.852	.	.
.800	.076	.	.	-2.581	.	.
.850	.032	.	.	-3.430	.	.
.900	.011	.	.	-4.499	.	.
.910	.009	.	.	-4.758	.	.
.920	.006	.	.	-5.038	.	.
.930	.005	.	.	-5.347	.	.
.940	.003	.	.	-5.691	.	.
.950	.002	.	.	-6.084	.	.
.960	.001	.	.	-6.545	.	.
.970	.001	.	.	-7.113	.	.
.980	.000	.	.	-7.867	.	.
.990	.000	.	.	-9.056	.	.

a. Logarithm base = 2.718.

L. acidophilus

Probit Analysis

Data Information

		N of Cases
Valid		91
Rejected	Missing	2
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	5
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	8	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a Dosis	-.140	.155	-.908	.364	-.444	.163
Intercept	-.172	.605	-.284	.776	-.777	.433

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 2.718 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	1.837	89	1.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	4600191.398	.	.	15.342	.	.
.020	660331.907	.	.	13.400	.	.
.030	192706.858	.	.	12.169	.	.
.040	76302.537	.	.	11.242	.	.
.050	35912.996	.	.	10.489	.	.
.060	18909.441	.	.	9.847	.	.
.070	10775.185	.	.	9.285	.	.
.080	6512.150	.	.	8.781	.	.
.090	4119.317	.	.	8.323	.	.
.100	2702.329	.	.	7.902	.	.
.150	471.747	.	.	6.156	.	.
.200	117.829	.	.	4.769	.	.
.250	35.842	.	.	3.579	.	.
.300	12.310	.	.	2.510	.	.
.350	4.572	.	.	1.520	.	.
.400	1.787	.	.	.580	.	.
.450	.720	.	.	-.329	.	.
.500	.294	.	.	-1.224	.	.
.550	.120	.	.	-2.119	.	.
.600	.048	.	.	-3.028	.	.
.650	.019	.	.	-3.968	.	.
.700	.007	.	.	-4.958	.	.
.750	.002	.	.	-6.027	.	.
.800	.001	.	.	-7.217	.	.
.850	.000	.	.	-8.604	.	.
.900	.000	.	.	-10.349	.	.
.910	.000	.	.	-10.771	.	.
.920	.000	.	.	-11.229	.	.
.930	.000	.	.	-11.732	.	.
.940	.000	.	.	-12.295	.	.
.950	.000	.	.	-12.936	.	.
.960	.000	.	.	-13.690	.	.
.970	.000	.	.	-14.616	.	.
.980	.000	.	.	-15.848	.	.
.990	.000	.	.	-17.789	.	.

a. Logarithm base = 2.718.

B. longum

Probit Analysis

Data Information

		N of Cases
Valid		90
Rejected	Missing	2
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	6
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	7	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a Dosis	-.182	.154	-1.177	.239	-.484	.121
Intercept	.034	.601	.056	.955	-.567	.635

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + BX$ (Covariates X are transformed using the base 2.718 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	2.462	88	1.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	442325.692	.	.	13.000	.	.
.020	98558.010	.	.	11.498	.	.
.030	38017.797	.	.	10.546	.	.
.040	18568.329	.	.	9.829	.	.
.050	10366.308	.	.	9.246	.	.
.060	6311.823	.	.	8.750	.	.
.070	4085.361	.	.	8.315	.	.
.080	2767.395	.	.	7.926	.	.
.090	1941.903	.	.	7.571	.	.
.100	1401.568	.	.	7.245	.	.
.150	363.327	.	.	5.895	.	.
.200	124.254	.	.	4.822	.	.
.250	49.492	.	.	3.902	.	.
.300	21.653	.	.	3.075	.	.
.350	10.066	.	.	2.309	.	.
.400	4.866	.	.	1.582	.	.
.450	2.409	.	.	.879	.	.
.500	1.206	.	.	.187	.	.
.550	.603	.	.	-.505	.	.
.600	.299	.	.	-1.208	.	.
.650	.144	.	.	-1.935	.	.
.700	.067	.	.	-2.701	.	.
.750	.029	.	.	-3.528	.	.
.800	.012	.	.	-4.449	.	.
.850	.004	.	.	-5.521	.	.
.900	.001	.	.	-6.872	.	.
.910	.001	.	.	-7.198	.	.
.920	.001	.	.	-7.552	.	.
.930	.000	.	.	-7.941	.	.
.940	.000	.	.	-8.376	.	.
.950	.000	.	.	-8.872	.	.
.960	.000	.	.	-9.455	.	.
.970	.000	.	.	-10.172	.	.
.980	.000	.	.	-11.125	.	.
.990	.000	.	.	-12.626	.	.

a. Logarithm base = 2.718.

Doxorrubicina HCl

Probit Analysis

Data Information

		N of Cases
Valid		16
Rejected	Missing	8
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	8	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a CD	-.022	.335	-.065	.948	-.678	.634
Intercept	-.566	.988	-.573	.567	-1.554	.422

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 2.718 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	.119	14	1.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for CD			95% Confidence Limits for log(CD) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	7.680E34	.	.	80.326	.	.
.020	3.048E29	.	.	67.890	.	.
.030	1.141E26	.	.	59.999	.	.
.040	3.014E23	.	.	54.063	.	.
.050	2.411E21	.	.	49.234	.	.
.060	3.957E19	.	.	45.124	.	.
.070	1.077E18	.	.	41.521	.	.
.080	4.277E16	.	.	38.295	.	.
.090	2.274E15	.	.	35.360	.	.
.100	1.526E14	.	.	32.659	.	.
.150	2.123E9	.	.	21.476	.	.
.200	293002.708	.	.	12.588	.	.
.250	142.994	.	.	4.963	.	.
.300	.152	.	.	-1.885	.	.
.350	.000	.	.	-8.230	.	.
.400	.000	.	.	-14.251	.	.
.450	.000	.	.	-20.077	.	.
.500	.000	.	.	-25.810	.	.
.550	.000	.	.	-31.543	.	.
.600	.000	.	.	-37.368	.	.
.650	.000	.	.	-43.390	.	.
.700	.000	.	.	-49.735	.	.
.750	.000	.	.	-56.582	.	.
.800	.000	.	.	-64.208	.	.
.850	.000	.	.	-73.096	.	.
.900	.000	.	.	-84.279	.	.
.910	.000	.	.	-86.980	.	.
.920	.000	.	.	-89.914	.	.
.930	.000	.	.	-93.141	.	.
.940	.000	.	.	-96.744	.	.
.950	.000	.	.	-100.854	.	.
.960	.000	.	.	-105.682	.	.
.970	.000	.	.	-111.618	.	.
.980	.000	.	.	-119.509	.	.
.990	.000	.	.	-131.946	.	.

a. Logarithm base = 2.718.

RESUMEN

Los probióticos (bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) son organismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas ejercen un efecto benéfico para la salud del huésped. Diversos trabajos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los probióticos detoxifican y tienen propiedades antimutagénicas, demostrando un efecto benéfico en cáncer colorrectal, el cuarto a nivel mundial en defunciones por cáncer. En algunos trabajos *in vitro* se ha observado que los factores extracelulares bacterianos presentan actividad biológica sobre protozoarios y bacterias de importancia médica, es por esto que en este trabajo se obtuvieron los liofilizados de factores extracelulares (LFE) de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum* y se determinó la actividad biológica sobre la línea tumoral de colon HT-29. Se inocularon estas cuatro cepas en un litro de medio caldo MPT a 37°C durante 24 h. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 20 min, se esterilizó con filtros Millipore de 0.22µm y así se obtuvieron los factores extracelulares; se liofilizaron y se preparó la solución madre y diluciones de cada cepa probiótica. Se utilizaron ocho concentraciones diferentes (430, 215, 107, 53, 26, 13, 7 y 3.5mg/mL) de los LFE. Se utilizó como control negativo de proliferación el compuesto químico doxorrubicina HCl. La actividad citotóxica demostró una tendencia dosis/respuesta y la última concentración obtuvo diferencia significativa ($p=0.05$). De las cepas *L. casei*, *L. plantarum*, y *B. longum* los LFE no tuvieron diferencia significativa entre ellas, las últimas dos diluciones de éstas si tuvieron diferencia estadística. Los LFE tuvieron diferencia significativa comparada contra el control químico, hubo un mayor efecto citotóxico, donde la inhibición del crecimiento de la línea celular HT-29 fue marcada (*L. casei* 62.7%, *L. plantarum* 61.5%, *L. acidophilus* 68.5% y *B. longum* 61.2% de inhibición de crecimiento). Los resultados nos permiten concluir que los LFE tienen actividad citotóxica contra la línea celular HT-29 de cáncer de colon humano, así como poseen potencial de agente preventivo.

ABSTRACT

Probiotics (bacteria of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*) are living organisms which when administered in adequate amounts exert a beneficial effect on host health. Several studies *in vivo* and *in vitro* have shown that probiotics are detoxified and antimutagenic properties, demonstrating a beneficial effect on colorectal cancer, the fourth worldwide in cancer deaths. Some studies *in vitro* have shown that bacterial extracellular factors have biological activity on protozoa and bacteria of medical importance, which is why in this work were obtained extracellular factors lyophilized (LFE) of *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* and *Bifidobacterium longum* and determined the biological activity on the colon tumor cell line HT-29. These four strains were inoculated in one liter of broth medium MPT at 37°C for 24 h. Then centrifuged at 2500 rpm for 20 min, sterilized with 0.22µm Millipore filters were obtained and thus extracellular factors, lyophilized, and the solution was prepared and dilutions of each probiotic strain. Used eight different concentrations (430, 215, 107, 53, 26, 13, 7 and 3.5mg/mL) of the LFE. Was used as a negative control proliferation chemical compound doxorubicin HCl. Cytotoxic activity showed a tendency dose/response and the last concentration obtained significant difference ($p=0.05$). Strains *L. casei*, *L. plantarum* and *B. longum* the LFE had no significant difference between them the last two dilutions of these if they had statistical difference. The LFE had significant difference compared to control chemical, there was a greater cytotoxic effect, where the growth inhibition of HT-29 cell line was marked (*L. casei* 62.7 %, *L. plantarum* 61.5 %, *L. acidophilus* 68.5% and *B. longum* 61.2 % inhibition of growth). The results allow us to conclude that the LFE have cytotoxic activity against cell line HT- 29 human colon cancer and have potential preventive agent.

1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud al huésped” (FAO/OMS, 2002). Como microorganismos probióticos se utilizan principalmente las bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque no exclusivamente.

Varios trabajos han demostrado que los probióticos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo, son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos y se utilizan para prevenir infecciones entéricas y gastrointestinales, así como también se ha reportado propiedades antimutagénicas y efecto benéfico en tratamiento de cáncer colorrectal en modelo murino (Fotiadis *et al.*, 2008; Wollowski *et al.*, 2001; Gupta y Garg, 2009; Patel y Patel, 2010).

Por otra parte, el cáncer de colon y recto puede aparecer en cualquier persona (sobre todo a partir de los 40 años), pero es más frecuente a partir de los 60 años (Jemal *et al.*, 2002). En el mundo el cáncer colorrectal ocupa el cuarto lugar con 608 000 defunciones (OMS, 2008). Se sabe que en el caso del cáncer de colon y de recto el principal factor involucrado es la dieta (Forman *et al.*, 2004; Armstrong y Doll, 1975; Willet, 2001).

El cáncer habitualmente comienza con la formación de un pólipo benigno o adenoma (una especie de verruga que sale por dentro del intestino). Con el tiempo, se transforma y va invadiendo las distintas capas que componen la pared del colon y el recto. Una vez que aparece esta situación, el cáncer se puede extenderse y puede producir metástasis. Se ha reportado el efectos de los probióticos sobre patologías en humanos, tales como en carcinogénesis, mutagénesis y tumores ya que los probióticos actúan en la absorción del mutágeno, estimulación del sistema inmunitario, inhibición de la producción carcinógena de la microflora intestinal (Lopez Brea y Domingo, 2007).

Se ha demostrado que la ingesta de probióticos aumenta la concentración de bacterias benéficas para la salud (lactobacilos y bifidobacterias) en las heces y reduce la de bacterias nocivas (clostridios y enterococos) (Guerin *et al*, 1998). También se ha demostrado que algunas cepas de probióticos reducen la actividad de las enzimas procancerígenas que sintetiza la microflora intestinal (Screefumar y Hosono, 2000).

Sin embargo, existen múltiples reportes en donde quedan de manifiesto, los efectos negativos que los probióticos pueden ocasionar en personas inmunodeprimidas, algunas cepas de lactobacilos han sido relacionadas con efectos perjudiciales, como por ejemplo raros casos de bacteriemia (Saxelin *et al.*, 1996), endocarditis (Mackay *et al*, 1999) y bsceso hepático en pacientes diabéticos (Rautio *et al*, 1999).

No obstante, los casos de asociación entre infecciones sistémicas y el consumo de probióticos es muy raro, y todos se han producido en pacientes inmunodeprimidos que estaban sometidos a tratamiento médico (FAO/OMS, 2001).

En trabajos recientes, se ha reportado la actividad inhibitoria de los factores extracelulares de varios probióticos sobre cultivos axénicos *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS (Barrón *et al.*, 2008), *Giardia lamblia* (Calderón, 2011; Ontiveros, 2011) y *Trichomonas vaginalis* (Ontiveros, 2011), así como en las bacterias *Salmonella sp*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocitógenes*, *Serratia marscecens* (García, 2011). Estos resultados brindan la posibilidad de realizar experimentos empleando únicamente los metabolitos producto de los probióticos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Probióticos

En 1857 Louis Pasteur descubrió las bacterias lácticas; en 1878, Lister reportó el aislamiento de bacterias a partir de leche ácida; en 1889, Henry Tissier descubrió especies de *Bifidobacterium*, y en 1900 *Lactobacillus acidophilus* fue descubierto por Moro. En 1908, Elie Metchnikoff, científico ruso que recibió el Premio Nóbel, observó que en Bulgaria un número increíble de personas vivían más de 100 años; este hecho lo relacionó con el gran consumo de bacterias en las leches fermentadas como una forma de modular la flora intestinal y así evitar enfermedades y alargar la vida de la gente. En 1908 por sus estudios en inmunidad celular, descubrió cualidades beneficiosas para la salud en la fermentación de la leche. Él observó que los lactobacilos transformaban la lactosa en ácido láctico, y que dicha acidez confería un ambiente hostil para las bacterias patógenas (Mennickent y Green, 2009; Figueroa *et al.*, 2006).

La aplicación terapéutica de los probióticos fuera del ámbito de las leches fermentadas fue instituida en 1906 por Tissier, quien utilizó cepas de *Bifidobacterium bifidum* aisladas tiempo atrás por él mismo (1899-1900) para aliviar infantes de diarrea (García-Garibay, 1996).

En 1930, Minoru Shirota aisló de heces humanas una cepa de *Lactobacillus casei*, que posteriormente cultivó en leche, originando una bebida con características probióticas.

Shirota atribuyó a este lactobacilo la capacidad de promover la salud intestinal y prevenir enfermedades mediante su consumo oral y en 1935 desarrolló el Yakult, siendo este producto la primera leche fermentada diseñada específicamente como probiótico. Shirota fue uno de los pioneros en el estudio de probióticos, aunque las bases científicas más sólidas de los verdaderos beneficios de estas bacterias en la

salud se han empezado a estudiar con mayor rigor científico desde mediados de la década de 1980 (Figueroa *et al.*, 2006).

La palabra probiótico fue inicialmente usada como un antónimo de la palabra “antibiótico”. Esta deriva de las palabras griegas $\pi\rho\omicron$ y $\beta\iota\omicron\tau\omicron\varsigma$ traducido como “por la vida” (Hamilton-Miller y col., 2003).

Vasilijevic 2008, refiere la historia del concepto, enunciado que el primero en utilizar esta palabra fue Kollan 1952, para describir la recuperación de la salud de pacientes malnutridos empleando suplementos orgánicos e inorgánicos y que un año después Vergin propuso, que el desbalance en el cuerpo debido al tratamiento con antibióticos. Posteriormente en 1955 Kolb reconoció los efectos detrimentales de la terapia con antibióticos y propuso utilizar a los probióticos como preventivo.

Lilly y Stillwell 1965 definieron los probióticos como sustancias producidas por un microorganismo que promueve el crecimiento de otros organismos. Sperti en 1971 y Fujji y Cook 1973 describieron a los probióticos como componentes que pueden estimular el crecimiento microbiano o mejorar la respuesta inmune del hospedero sin inhibir el crecimiento de un cultivo *in vitro*. Paker 1974 los definió como organismos y sustancias las cuales contribuyen al balance microbiano del intestino. Esta definición fue criticada por muchos autores debido a que al decir “sustancias”, pueden quedar incluidos los antibióticos (Vasilijevic, 2008).

Fuller 1992 definió “suplemento alimenticio de microorganismos vivos, los cuales afectan benéficamente al animal hospedero por el mejoramiento de su balance microbiano intestinal”. En 1999 Salminen y colaboradores ofrecieron su definición incorporando bacterias no viables en la misma (Holzapfel *et al.*, 1998).

Los probióticos son organismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso para el hospedador, precisando que ese

beneficio puede ser fisiológico (Reid *et al.*, 2003) o para la salud (FAO/OMS, 2001).

Las diversas definiciones propuestas para el término “probiótico” configuran características que debe reunir una cepa microbiana para ser incluida en dicho término. A continuación se enumeran requisitos con aportaciones de diversos autores (Salminen *et al.*, 1996; 2005; Dunne *et al.*, 1999; Casas y Dobrogosz, 2000; Reid *et al.*, 2003):

- a) Identificación de la cepa: se considera imprescindible una correcta identificación de la cepa utilizando para ello técnicas fenotípicas y genotípicas.
- b) Origen humano: las cepas aisladas de seres humanos sanos probablemente carecen de patogenicidad y presentan mayor facilidad para colonizar el intestino humano. Sin embargo se utilizan como probióticos cepas de otros orígenes.
- c) Bioseguridad: la ausencia de patogenicidad, debe investigarse la ausencia de producción de toxinas, de actividad hemolítica y de infectividad en modelos exigentes como pueden ser animales experimentalmente inmunocomprometidos.
- d) Tolerancia a las condiciones ambientales del tracto intestinal: si los microorganismos probióticos deben llegar viables al intestino, es preciso que resistan el pH gástrico, las enzimas digestivas, y la acción de detergente e inhibidora de las sales biliares. Esta resistencia no tiene que entenderse en términos absolutos: la ingestión de inóculos con un alto número de microorganismos probióticos permite que una cantidad suficiente de ellos permanezca viable al llegar al intestino, aunque su número se haya reducido drásticamente por inactivación en el estómago.
- e) Adherencia al epitelio intestinal: aunque los probióticos se ingieren como microorganismos exógenos, idealmente debieran colonizar el intestino de forma persistente, para lo cual es necesario que posean la capacidad de adherirse a los enterocitos.

- f) Producción de antibiosis: la producción de sustancias antimicrobianas se considera uno de los mecanismos por los que los microorganismos probióticos suministran protección frente a los enteropatógenos. Esta antibiosis puede ser ejercida a través de mecanismos metabólicos generales como la producción de ácidos orgánicos o de radicales oxidantes o bien por la producción de antibióticos.
- g) Capacidad para actuar como interfaz metabólico: actuar como un escudo metabólico que impida la llegada de agentes nocivos a los enterocitos. Algunos microorganismos probióticos interfieren con la asimilación del colesterol, hidrolizan la lactosa, o inactivan agentes cancerígenos.
- h) Modificación de la respuesta biológica: varios de los efectos más importantes atribuidos a los probióticos se ejercen a través de su actividad inmunomoduladora: es el caso de la protección frente a infecciones intestinales o extraintestinales, la inhibición de tumores ya establecidos, efectos antiinflamatorios y antialérgicos. La inmunomodulación puede deberse a estructuras microbianas o a metabolitos bioactivos producidos incluso previamente a su ingestión (por ejemplo péptidos bioactivos procedentes de la digestión microbiana de proteínas lácteas). Esta característica no debe considerarse absoluta ya que es concebible que un microorganismo ejerza efectos probióticos por otras vías.
- i) Viabilidad de la fabricación a escala comercial de productos conteniendo la o las cepas probióticas: una cepa que no resista los procesos tecnológicos de producción o no mantenga su actividad en vehículos apropiados, no podrá tener aplicación como probiótico por excelentes que sean sus propiedades en los ensayos biológicos.

Hasta la fecha, la ingestión de cepas de probióticos no ha dado lugar a una colonización y supervivencia duraderas y mensurables en el huésped. Invariablemente, los microorganismos persisten días o semanas, pero no más tiempo (Tannock *et al.*, 2000). Por lo tanto, la utilización de probióticos confiere

probablemente efectos más transitorios que duraderos, por lo que parece ser necesaria una ingestión continuada.

Las bacterias probióticas pueden incrementar la resistencia contra los patógenos intestinales mediante mecanismos antimicrobianos. Estos incluyen la colonización competitiva y la producción de ácidos orgánicos, como los ácidos láctico y acético, bacteriocinas y otros metabolitos primarios como el peróxido de hidrógeno y el dióxido de carbono. La producción de ácidos orgánicos por las bacterias probióticas disminuye el pH intestinal y por lo tanto se inhibe el crecimiento de patógenos. Estos ácidos orgánicos incrementan los movimientos peristálticos, lo que de manera indirecta remueve los patógenos acelerando la velocidad con la que atraviesan el intestino. El peróxido de hidrógeno producido puede funcionar a través del sistema lactoperoxidasatiocianato, en el cual el peróxido de hidrógeno oxida el tiocianato para convertirlo en ácido hidrocianico que es perjudicial para los patógenos. El dióxido de carbono y el diacetil sintetizado por las bacterias ácido lácticas inhiben el crecimiento de patógenos. Numerosas bacteriocinas, como acidofilina, lactobacilina, acidolina, lactocidina y lactolina muestran acción antagónica contra los patógenos (Fig. 1) (Kailasapathy y Chin, 2000).

La interferencia microbiana es un fenómeno en el cual los microorganismos ya establecidos en un ecosistema previenen que colonicen otro tipo de microorganismos el mismo sitio. Ocurre en la naturaleza, en lo particular en ecosistemas asociados con cuerpos animales. La interferencia microbiana, también conocida como resistencia a la colonización, es la primera línea de defensa con infecciones por microorganismos patógenos que causan enfermedades. Es ejercida por la microbiota y es una resistencia importante no específica para el huésped.

Ha sido investigada en el tracto gastrointestinal; la evidencia de que es un importante mecanismo de resistencia es dada por tres tipos de estudio: sujetos tratados con antibióticos, animales gnotobióticos y animales bajo estrés (Tannock, 1995).

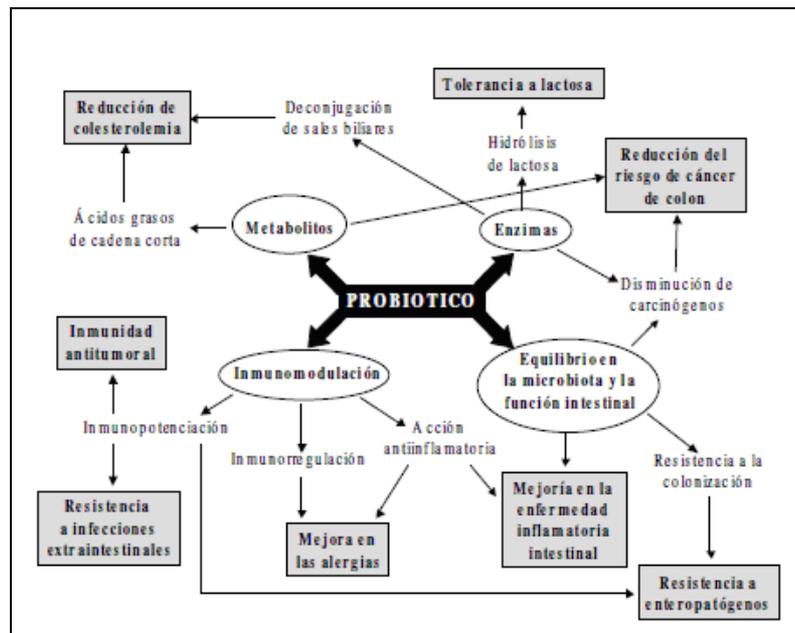


Fig. 1. Efectos beneficios atribuidos a los microorganismos probióticos y sus posibles mecanismos (tomado de Bujalance, 2006).

2.1.1 Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas son bacterias Gram positivas no esporuladas que tienen en común la capacidad de producir ácido láctico por fermentación utilizando azúcares como sustrato. Son microorganismos que requieren factores de crecimiento complejos como vitaminas del grupo B, purinas, pirimidinas y aminoácidos (García-Garibay, 1996). Dado que carecen de porfirinas y citocromos, no realizan fosforilación por transporte de electrones, reciben energía por fosforilación a nivel sustrato.

Producen energía únicamente por fermentación. Carecen de la capacidad de biosíntesis del grupo hemo, razón por la cual son catalasa negativa. Crecen en presencia o ausencia de O₂, por lo que algunas bacterias son anaerobias facultativas y otras obligadas. Forman colonias pequeñas nunca pigmentadas, asociadas a la ausencia de citocromos.

Las bacterias lácticas se distinguen por su tolerancia a la acidez, pueden seguir creciendo aún a valores de pH menores a 5.0. Se agrupan las especies de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* y *Pediococcus*.

2.1.2 *Lactobacillus sp.*

Un miembro característico del grupo de bacterias del ácido láctico es el género *Lactobacillus* (Beijerinck 1901). Los lactobacilos son bacilos o cocobacilos gram-positivos no esporulados, que, como miembros del *Phylum Firmicutes*, tienen un contenido en guanina-citocina inferior al 50%; aerotolerantes o anaerobios, su metabolismo es estrictamente fermentativo, distinguiéndose especies homofermentadoras (el ácido láctico supera el 85% de los productos de fermentación de glucosa) y heterofermentadores (producen ácido láctico, CO₂, etanol y/o ácido acético en proporciones equimoleculares), y sus complejos requerimientos nutritivos reflejan sus nichos ecológicos, ricos en carbohidratos: plantas y residuos vegetales, alimentos fermentados y como componentes de la microbiota de compartimentos del cuerpo de animales (especialmente el intestino) (Tannock, 2004).

En la actualidad se conocen 56 especies del género *Lactobacillus* distribuidas en varios nichos ecológicos como son el tracto gastrointestinal y el tracto genital y constituyen parte importante de la microflora endógena del humano. Su distribución se ve afectada por varios factores ambientales, los cuales incluyen pH, disponibilidad de oxígeno, nivel de sustratos específicos, presencia de secreciones e interacción bacteriana (Gomes y Malcata, 1999).

De gran importancia en la actualidad, el *Lactobacillus casei* Shirota es una bacteria ácido láctica que se encuentra en muchos productos: verduras fermentadas, carne y productos de leche fermentada. Además se encuentra en el tracto intestinal y genital de animales y humanos. *L. casei* Shirota es una bacteria anaerobia ácido tolerante con un metabolismo fermentativo estricto con el ácido

láctico en mayores cantidades como producto final, puede ser utilizada ampliamente en la industria por sus propiedades probióticas (Figueroa *et al.*, 2006).

Metchnikoff, sugirió que algunos de los síntomas del metabolismo gastrointestinal enfermo podrían neutralizarse a través de *L. casei* Shirota utilizando como medio el yogur (Saloff-Coste, 1997).

Algunos de los beneficios del *Lactobacillus casei* Shirota son fortalecer la flora intestinal; logrando mantenerla en equilibrio y con ello promover la regulación de los movimientos peristálticos (movimiento natural de los intestinos), ayudar a reducir las sustancias tóxicas producidas por las bacterias putrefactivas, incrementar el número de bacterias benéficas en los intestinos, disminuir los niveles altos de colesterol en sangre y estimular el sistema inmunológico (<http://www.yakult.com> accesado 4/oct/2013).

L. casei Shirota modula la flora intestinal, tiene efectos positivos en tratamientos contra el cáncer y disminución de la actividad enzimática en las heces fecales (Ouwehand *et al.*, 1999).

El *L. acidophilus* se encuentra de forma natural en el tracto gastrointestinal en humanos y en algunas leches que se fermentan de manera tradicional, tales como el kefir. Irónicamente, la mayoría de las cepas de *L. acidophilus* no sobreviven adecuadamente en la leche fermentada debido al pH bajo, y es difícil mantener un número grande de ellos en el producto. Por estas razones, los productos de leche fermentada que contienen esta bacteria frecuentemente se producen en forma separada y después se mezclan. Algunos ejemplos incluyen la adición de este microorganismo a los cultivos de yogur. Este microorganismo es considerado como probiótico debido a que su consumo en ciertas cantidades puede ejercer diversos beneficios sobre la salud y no sólo se encuentran limitados al mejoramiento del balance microbiano, sino que también tiene otros efectos,

tales como el alivio de la intolerancia a la lactosa o la modulación del sistema inmunitario (Salminen *et al*, 1998).

De otras bacterias menos conocidas como *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, y *Saccharomyces boulardii* se ha encontrado que tienen efectos sobre la salud (Tabla 1), tales como alivio o disminución de la intolerancia a la lactosa, estabilización de la microflora intestinal a través del mejoramiento en la adherencia de células a la mucosa intestinal o la reducción de la duración de la diarrea mediante la colonización del tracto intestinal (Saloff-Coste, 1997).

Tabla 1. Microorganismos probióticos

Género	Especie	Efecto clínico en humanos
<i>Lactobacillus</i>	<i>GG</i>	Adherencia a las células intestinales, estimulación de la respuesta inmune, prevención de la diarrea patogénica.
	<i>johnsonii</i>	Prevención de la diarrea del viajero, modulación de la flora intestinal, alivio de la intolerancia a la lactosa.
	<i>casei</i> <i>Shirota</i>	Modulación de la flora intestinal, efectos positivos en tratamientos contra el cáncer, disminución de la actividad enzimática en las heces fecales.
	<i>plantarum</i>	Adherencia a las células intestinales humanas, modulación de la flora intestinal.
	<i>acidophilus</i>	Inhibición de bacterias patógenas, adhesión a las células intestinales humanas.
	<i>reuteri</i>	Colonización del tracto gastrointestinal.
	<i>bulgaricus</i>	Reduce o elimina los síntomas de intolerancia a la lactosa.
<i>Bifidobacterium</i>	<i>bifidum</i>	Reduce la duración de la diarrea y aumenta la respuesta inmunológica de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena, <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ejerciendo un efecto antagonista o una actividad antimicrobiana (Mattila-Sandholm <i>et al.</i> , 1999).
	<i>lactis</i>	Prevención de la diarrea del viajero, tratamiento contra la diarrea viral incluyendo rotavirus, modulación de la respuesta inmune.
	<i>longum</i>	Exclusión competitiva de <i>Escherichia coli</i> , inhibición de <i>E. coli</i> de la superficie de la mucosa intestinal humana.
<i>Saccharomyces boulardii</i>		Prevención de la diarrea causada por antibióticos, tratamiento contra la colitis causada por <i>Clostridium difficile colitis</i> .

Tomado de Ouwehand *et al.* (1999)

2.1.3 Bifidobacterias

Henry Tissier, un médico pediatra francés, observó que los niños con diarrea tenían una baja cantidad de bifidobacterias en sus heces. Estas bacterias, por el contrario, eran abundantes en los niños sanos. Tissier postuló que la administración de bifidobacterias a pacientes con diarrea podría ayudar a restaurar su flora intestinal (Mennickent y Green, 2009).

Las bifidobacterias forman parte de las bacterias anaerobias que se instalan en primer lugar en el intestino de los recién nacidos; factores exógenos como los oligosacáridos presentes en la leche materna contribuyen a la colonización intestinal por estas poblaciones bacterianas concretas (Moreau y Gaboriau, 2000). Las bifidobacterias son bacilos gram-positivos con alto contenido G + C, con una peculiar morfología bacilar que suele ramificarse en los extremos, anaerobios facultativas, catalasa negativa, no producen gas, no esporulados e inmóviles, que habitan en el tracto intestinal de animales y en aguas residuales (Prescott *et al.*, 2005; Sakata *et al.*, 2006, Chung *et al.*, 1999). El género *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, comprende 33 especies reconocidas (Euzéby, 2006), 10 de las cuales (*Bifidobacterium adolescentes*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. gallicum* y *B. dentium*) se han identificado como componentes de la microbiota intestinal humana (Kóová *et al.*, 2006).

Generalmente, las bifidobacterias se encuentran en cantidades superiores a 10^{10} por cada gramo de contenido intestinal y comprenden cerca del 25% de la microflora; sin embargo, la cantidad de bacterias va disminuyendo con la edad, estado de salud y dieta (Fig. 2) (Linder *et al.*, 2007).

Bifidobacterium longum predomina a nivel de colon transversa y descendente, e interviene en la producción de una gran cantidad de sustancias involucradas en el metabolismo del individuo.

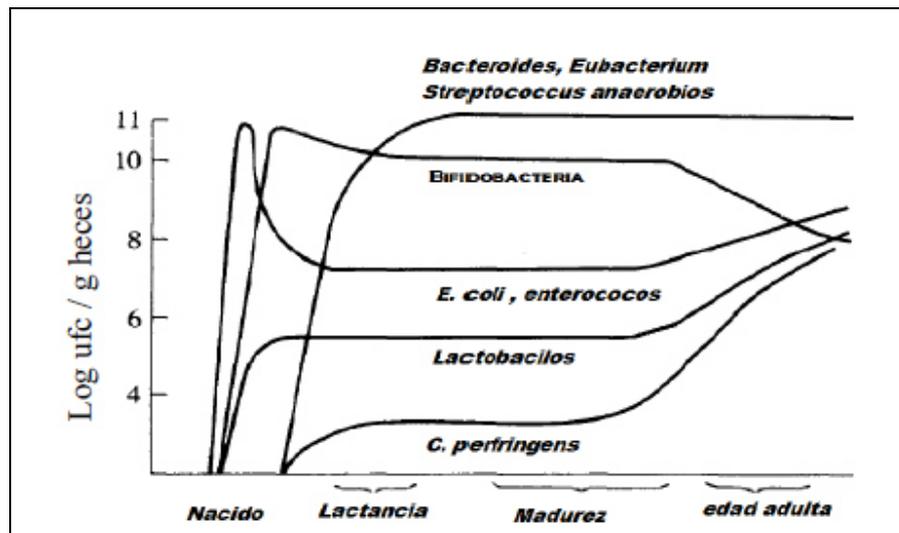


Fig. 2. Cambios en la microbiota intestinal con la edad (imagen tomada de Lourens-Hatlingh y Viljoen, 2001).

La mayoría de las cepas de bifidobacterias que son importantes para humanos, crecen a una temperatura óptima de 36-38°C; son ácido-tolerantes y el pH óptimo para su crecimiento se encuentra entre 6.5 y 7.0, las cepas que se mantienen en un pH superior a 8.5 no sobreviven (Biavati *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 1999).

2.2 Tracto digestivo

El tubo digestivo está formado por cavidad oral, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y ano. Su organización histológica general comprende, desde la luz del tubo, el epitelio mucosal, la *lámina propria*, la submucosa, una túnica muscular y una túnica adventicia (faringe, esófago y recto) o serosa. La mucosa digestiva, en especial la intestinal, constituye una frontera crítica entre un medio externo especial (espacio luminal) y el medio interno: a través de ella pasan nutrientes, electrolitos y agua, pero también pueden hacerlo toxinas de diverso origen y está en contacto con un enorme número de microorganismos (Turner, 2003).

La mucosa intestinal, que es la mayor superficie del cuerpo en contacto con un ambiente externo (200 a 300m²), está relacionada con células y tejidos inmunitarios, formando una línea defensiva que ofrece, a la vez, nichos ecológicos óptimos para numerosos microorganismos y eficaces mecanismos antimicrobianos: el resultado es un ecosistema complejo y dinámico (Fig. 3) (Liévin y Servin, 2006).

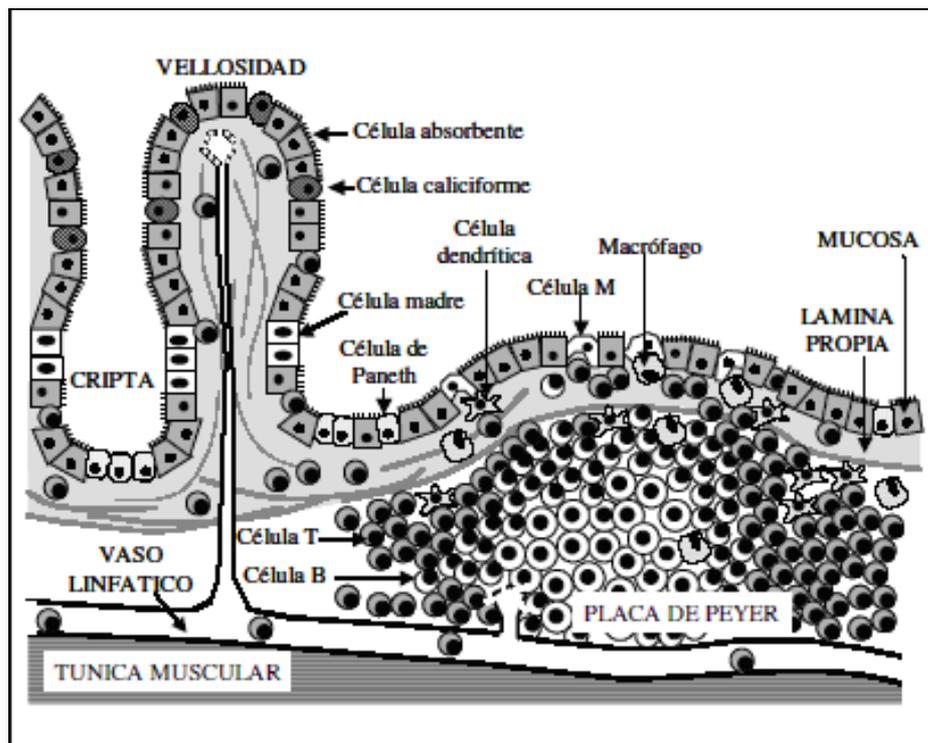


Fig. 3. Esquema de organización histológica en el intestino delgado (tomado de Bujalance 2006).

En una mucosa intestinal intacta, las uniones entre los enterocitos constituyen una excelente barrera que excluye el paso de macromoléculas y patógenos (Dotan y Mayer, 2003). Además, las células de Paneth, abundantes en el fondo de las criptas de Lieberkühn, protagonizan importantes funciones defensivas inespecíficas: en respuesta a estímulos diversos, ya sean productos bacterianos (lipopolisacárido, peptidoglicano y ácidos lipoteicoicos), neurotransmisores (acetilcolina) o citocinas producidas por linfocitos, producen una diversidad de agentes antimicrobianos (lisozima, defensinas, fosfolipasa A₂), citocinas proinflamatorias y estimuladoras

(tumor necrosis factor α o TNF- α , colony stimulating factor-1 o CSF-1, epithelial growth factor o EGF), enzimas y otras moléculas que participan en la defensa frente a microorganismos, la respuesta inflamatoria, el crecimiento de células epiteliales y otras funciones metabólicas (Keshav, 2004).

Finalmente, la mucosa intestinal está protegida por dos capas de glicoconjugados: unidas a la superficie celular, las glicoproteínas y glicolípidos del glicocálix; y, por encima de éstas, la secreción mucosa de las células caliciformes (Freitas y Cayuela, 2000). Esta secreción es un gel formado por mucinas, proteínas que poseen cadenas de oligosacáridos unidos a serinas, prolinas y treoninas, pudiendo representar la parte glucídica hasta el 80% de la masa molecular (Liévin y Servin, 2006). Además de proteger y lubricar la superficie de la mucosa, el gel constituye una barrera para ciertos enteropatógenos como *Yersinia enterocolitica* o *Shigella flexneri*, así como para los rotavirus (Liévin y Servin, 2006). Las mucinas son degradadas por glicosidasas y esterases de bacterias de la microbiota (Freitas y Cayuela, 2000), lo que suministra nutrientes para el crecimiento bacteriano, de lo que se pueden aprovechar también algunos microorganismos patógenos que se adhieren al mucus (Macfarlane *et al.*, 2000).

2.3 Microbiota del tracto digestivo

Dado que el calostro materno, en condiciones normales, es un ambiente estéril, los mamíferos nacen sin microorganismos comensales, pero la colonización de los distintos nichos biológicos que ofrece el organismo comienza al atravesar el canal del parto y prosigue hasta el establecimiento de comunidades microbianas estables.

Durante los primeros días de vida la microbiota está compuesta principalmente por enterobacterias y estreptococos y se vuelve más diversa con el tiempo (Fig. 4) (Arunachalam, 1999). Se calcula que la microbiota del tracto digestivo de un adulto contiene hasta 10^{14} bacterias viables (Liévin y Servin, 2006).

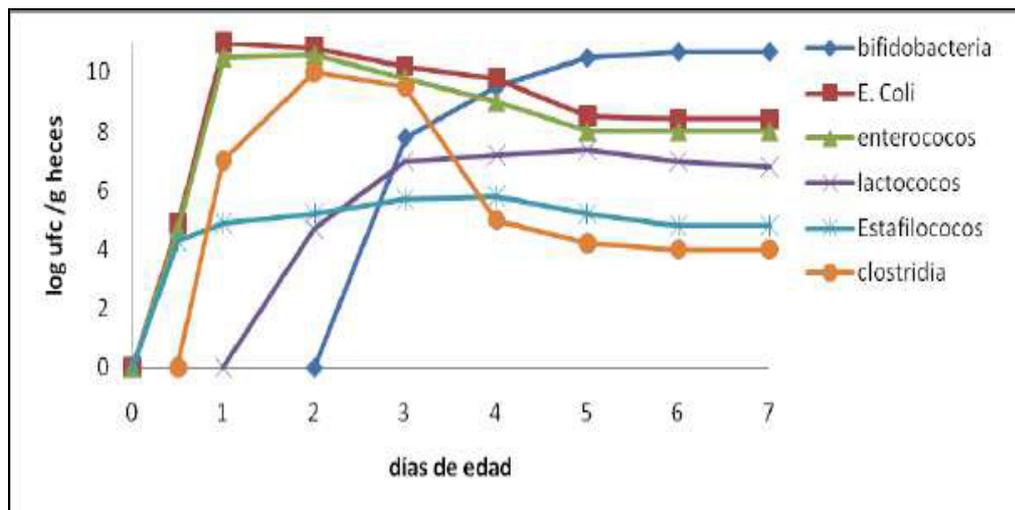


Fig. 4. Cambios en la microbiota intestinal en infantes desde recién nacidos hasta 7 días de edad (tomado de Arunachalam, 1999).

En adultos sanos la composición de la microbiota varía entre individuos y se mantiene estable a través de una gran parte de nuestra vida. Se observó en pacientes ancianos que la composición fecal cambia con el incremento de la edad y disminuye el número total de bifidobacterias junto con la disminución de otra diversidad de especies (Woodmansey *et al.*, 2004). La presencia de bifidobacterias en heces humanas está asociada con el buen estado de salud y se ha encontrado que existen diferencias al comparar la composición microbiana entre individuos sanos y enfermos (Seksi *et al.*, 2003).

El aparato digestivo, donde existen más de 400 especies bacterianas (Tannock, 1999) más de la mitad del peso de la materia que se encuentra en el colon corresponde a células bacterianas cuyo número es diez veces superior al de las células de los tejidos que constituyen el cuerpo humano. El estómago contiene normalmente pocas bacterias (10^3 UFC/mL de jugo gástrico), mientras que la concentración bacteriana aumenta a lo largo del intestino hasta llegar a una concentración final en el colon de 10^{12} UFC/g.

La mayoría de las bacterias ingeridas con la saliva o los alimentos no son capaces de sobrevivir mucho tiempo en el estómago, dada la acidez del pH gástrico, que sólo permite la supervivencia de especies ácido-tolerantes como algunos estreptococcus, lactobacilos y *Helicobacter pylori*. En el intestino delgado el pH se neutraliza, los microorganismos viables puede elevarse hasta 10^9 en el íleon; las especies presentes pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Actinomyces* y *Bacteroides* así como a miembros de la familia *Enterobacterium*. En el intestino grueso existen anaerobios estrictos (géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*) y en menor cantidad anaerobios facultativos como las enterobacterias (Figs. 5 y 6) (Kleessen *et al.*, 2000; Moreau y Gaboriau, 2000).

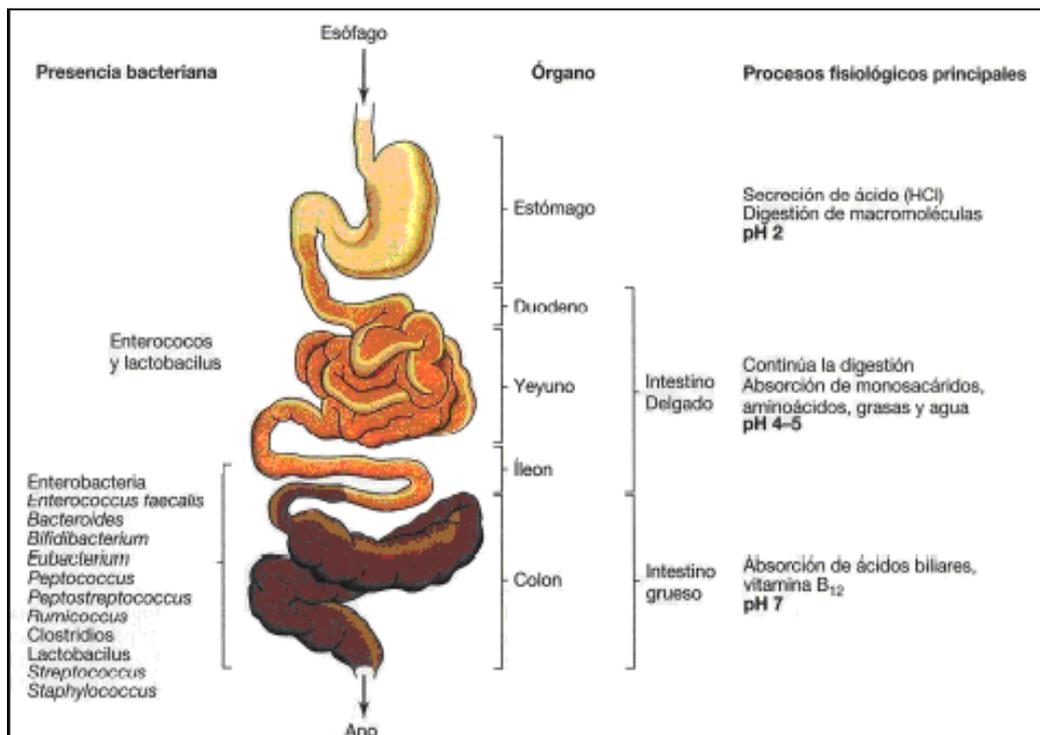


Fig. 5. Microbiota del tracto digestivo (imagen tomada de Madigan *et al.*, 2006).

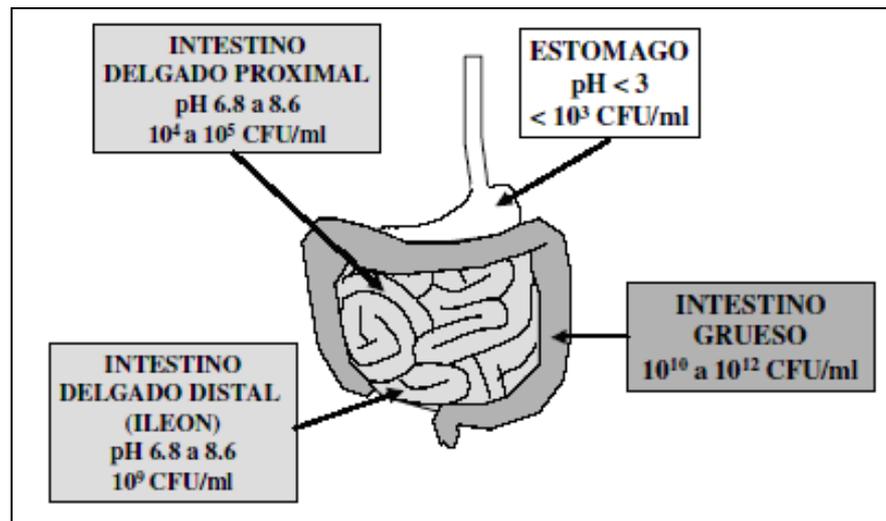


Fig. 6. Concentración de microorganismos en el tracto Gastrointestinal (imagen tomada de Bujalance, 2006).

La configuración definitiva de la microbiota intestinal es el resultado de dos tipos de presiones selectivas: “desde arriba”, las presiones impuestas por el hospedador, lo que incluye las características de los nichos ecológicos ofrecidos y los mecanismos inmunitarios, y que seleccionan una diversidad de linajes microbianos cuyos genomas contienen conjuntos similares de genes (redundancia funcional); y “desde abajo”, las presiones debidas a la competición entre microorganismos, lo que promueve la selección de genomas especializados, con conjuntos de genes funcionalmente distintos (Ley *et al.*, 2006). Una vez establecidas, las poblaciones que constituyen la microbiota intestinal son estables, aunque algunos estudios longitudinales muestran variaciones en los recuentos de determinadas especies, como *Bacteroides thetaiotaomicron* o *Clostridium perfringens* (Kleessen *et al.*, 2000). Incluso después de las perturbaciones inducidas por tratamientos antimicrobianos, las poblaciones originales retornan (De La Cochetière *et al.*, 2005). Es interesante reseñar que, en opinión de expertos, la administración de prebióticos puede tener un impacto mayor sobre la microbiota que la de probióticos (Walker y Buckley, 2006); es el caso de la administración de inulina, que incrementa el número de bifidobacterias indígenas (Gibson *et al.*, 1995).

Entre las funciones atribuidas a la microbiota intestinal se pueden citar las siguientes: modificación del contenido intestinal (pH, potencial redox, producción de metabolitos como vitaminas y enzimas digestivas), modificaciones anatómico-funcionales del tracto digestivo (disminución del volumen fecal por acción mucolítica, tasa de renovación de enterocitos, diferenciación de las células de la mucosa, aceleración del tránsito intestinal), resistencia a infecciones intestinales (por mecanismos directos como la competencia por nutrientes o la producción de sustancias antibióticas, e indirectos a través de la potenciación de la inmunidad mucosal), desarrollo del GALT (tejido linfoide asociado a intestino) y regulación de los mecanismos inmunitarios (Fig. 7) (Moreau y Gaboriau, 2000; Liévin y Servin, 2006).

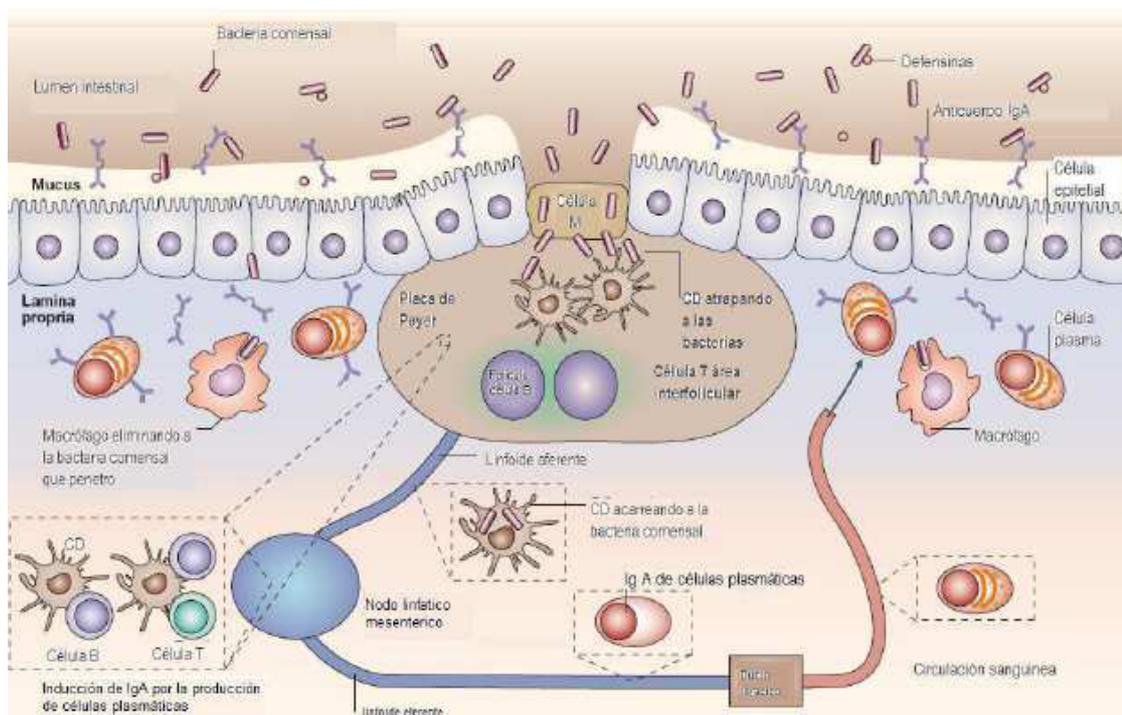


Fig. 7. Defensa inmune contra la bacteria comensal del intestino (imagen tomada de González, 2009).

Una función importante de la microbiota es su contribución al desarrollo de la mucosa. Los glicoconjugados que constituyen el glicocáliz de las células de la mucosa intestinal tienen una gran importancia ya que están implicados en mecanismos de reconocimiento molecular que incluyen procesos de adhesión y diferenciación celular, regulación, comunicación y transducción de señales e infección por bacterias y virus (Freitas y Cayuela, 2000).

2.4 Importancia de los probióticos en la flora gastrointestinal

El colon es uno de los órganos metabólicamente más activos del cuerpo humano, y juega un papel muy importante en la nutrición y en la salud. Entre los distintos componentes de la microflora colonica se encuentran algunas bacterias (bifidobacterias y lactobacilos) que impiden el crecimiento de las bacterias nocivas para la salud humana y, por ello, en la actualidad hay un gran interés en mejorar el desarrollo de las que son benéficas, disminuyendo así el crecimiento de las potencialmente patógenas. Ningún organismo elabora bacterias, es decir, no las genera, simplemente éstas se hospedan en nuestro intestino. Su incorporación es siempre externa. Durante la vida intrauterina, la luz intestinal permanece estéril pero la colonización comienza inmediatamente luego del nacimiento y alcanza una estabilidad duradera hacia el primer año de vida. Dicha estabilidad puede ser alterada durante episodios de infecciones intestinales, tratamientos con antibióticos, inmunodeficiencias transitorias o crónicas y en la vejez (Mateos, 2002).

La microbiota siempre está activa y se renueva aproximadamente cada 48 h. Un factor externo que incide en la composición de la flora es la dieta y esto es particularmente evidente durante la lactancia. Los microorganismos intestinales comprenden alrededor de 100 especies, en un número de 10^{14} células individuales colonizan la parte baja del intestino delgado y el intestino grueso, donde hay ausencia de oxígeno, formando un ecosistema de la microflora intestinal. Esta

flora incluye microorganismos benéficos, patógenos y neutrales, los cuales tienen relación estrecha con la salud. El pequeño porcentaje de microorganismos patógenos es de gran importancia, ya que van a tener en alerta al sistema inmunológico, reactivando las defensas locales, en cada parte del tracto digestivo (Rasic y Kurmann, 1983). Por esto al intestino se le denomina “la cuna del sistema inmune” (Keseel y Klupsch, 1984). Las bifidobacterias son las más importantes para la salud, ya que ayudan a tener un buen equilibrio con toda la flora intestinal.

En términos microbiológicos, el tracto gastrointestinal (GI) puede ser entendido en función de tres regiones principales: estómago, intestino y colon; cada una de las cuales poseen una disposición de la población microbiana muy singular (Rastall, 2004). La microflora del colon se ha convertido en el objetivo principal de las intervenciones dietéticas, debido a que estos microorganismos ayudan a completar la digestión (a través del proceso de fermentación) protegen contra las bacterias patógenas y estimulan el desarrollo del sistema inmune (Macfarlane y Cummings, 1999).

La cantidad de oxígeno presente en el tracto digestivo depende del sitio mientras hay una cantidad apreciable en el estómago e intestino delgado, el segmento inferior del intestino delgado y el intestino grueso contienen muy poco. La distribución intestinal de los microorganismos depende de la cantidad de oxígeno presente. Las bacterias ácido lácticas, que se desarrollan independientes de la cantidad de oxígeno presente (anaeróbicas facultativas), colonizan el intestino delgado. Las bifidobacterias, las cuales sobreviven y se desarrollan en ausencia de oxígeno (anaerobias obligadas), predominan en el intestino grueso.

El estómago y la parte superior del intestino delgado contienen pocas bacterias, ya que allí los alimentos se mueven más rápidamente, además la saliva contiene lisozima, que es una enzima bacteriolítica, el pH del fluido gástrico es demasiado bajo y el pH de la bilis es demasiado alto. Cada región del tracto gastrointestinal

posee una disposición de la población microbiana muy singular así se observa en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2.
Características de la microbiota del tracto gastrointestinal

Región Gastrointestinal	Características de la microflora	Ejemplos
Estómago	-Muy bajo número de bacterias -Presencia de anaerobios facultativos -Presencia de solo 10^3 UFC/ mL -pH ácido	- <i>Lactobacilos spp.</i> - <i>Streptococos spp.</i>
Intestino	-Mayor carga bacteriana. -Presencia de anaerobios, enterobacterias y anaerobios facultativos.	- <i>Lactobacilos spp.</i> - <i>Streptococos spp.</i> - <i>Bifidobacterium spp.</i> - <i>Bacteroides spp.</i> - <i>Clostridium spp.</i>
Colon	-La región con mayor carga bacteriana -Presencia de 10^{11} - 10^{12} (UFC)/ mL -Presencia de anaerobios estrictos, enterobacterias y anaerobios facultativos, en menor medida.	- <i>Peptococos spp.</i> - <i>Bifidobacterium spp.</i> - <i>Bacteroides spp.</i> - <i>Clostridium spp.</i> - <i>Atopobium spp.</i>

Tomado de Rastall (2004)

El uso de probióticos ha sido estudiado en varias patologías digestivas, entre ellas aquellas que incluyen alteración en el equilibrio de la flora gastrointestinal, siendo las más comunes: la diarrea asociada al empleo de antibióticos, la diarrea aguda (sobre todo en población pediátrica), la intolerancia a la lactosa, el síndrome de intestino irritable, las infecciones por *H. pylori* y la enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras (Martínez, 2001). En los últimos años, los probióticos han adquirido una considerable importancia como microorganismos capaces de ejercer un beneficio sobre la salud, por ejemplo en la prevención y en el tratamiento de desórdenes intestinales, en la reducción del riesgo de cáncer o en la modulación de la respuesta inmune, tal como lo demostró Bujalance *et al.*, 2007 en un estudio donde empleó *L. plantarum* como inmunomodulador; ya que este estimuló significativamente a los esplenocitos en respuesta a la concavalina A y al mitógeno de las células T (Puertollano *et al.*, 2005).

2.5 Cáncer

Una de las situaciones clínicas reseñadas como susceptibles de ser mejoradas por la ingestión de probióticos es la aparición de carcinoma de colon (Ruiz *et al.*, 1992). En el mundo el cáncer colorrectal ocupa el cuarto lugar con 608 000 defunciones (OMS, 2008). En México, durante 2010 se observó que los principales tumores malignos que afectan a la población femenina adulta (de 20 años y más) que fue hospitalizada por este diagnóstico eran el cáncer de mama (24.3%), el cervicouterino (9.7%) y el de colon (3.2%); mientras que en los varones adultos se concentran en cáncer de próstata (7.9%), bronquios y pulmón (4.9%) y colon (4.6%). En 2011, entre los principales tumores malignos por lo que fallece la población de 20 años y más en México, se observan diferencias significativas entre hombres y mujeres. Las mujeres mueren por cáncer de mama (13.8%), cervicouterino (10.4%), de estómago (7%), hígado y vías biliares intrahepáticas (5.5%) y de colon (4.3%). En tanto que los hombres fallecen por cáncer de próstata (16.9%), de bronquios y pulmón (12.8%), de estómago (8.6%), hígado y vías biliares intrahepáticas (5.3%) y de colon (5.3%) (INEGI, 2011).

El tumor de cáncer de colon se inicia por acción de carcinógenos químicos mutágenos, y se le reconoce un desarrollo gradual, por etapas que abarcan desde lesiones pretumorales (epitelio hiperplásico), pasando por varias formas de adenomas, hasta llegar al carcinoma invasor y metastásico, estando cada etapa definida por la activación de oncogenes o la inactivación de diversos genes supresores (Ruiz *et al.*, 1992).

Los hábitos alimenticios en las áreas de gran incidencia incluyen la ingesta calórica en exceso del requerimiento, bajo contenido de vegetales no absorbibles (fibra), preferencia de carne roja, exceso en el consumo de carbohidratos refinados con bajo contenido micronutrientes que dan protección. La digestión de algunos de estos productos ha sido encontrada capaz de potenciar carcinogénesis produciendo daño en el DNA en las células de las criptas liderando mutación de

genes que se incluyen adenomatous polyposis coli (APC), Kirsten-ras (K-ras) y p53 (proteína 53 kilodaltones) (Fotiadis *et al.*, 2008; Sidhus *et al.*, 2010).

Algunos investigadores han demostrado la propiedad detoxificante y antimutagénica de microflora bacteriana intestinal no patógena (probióticos) e ingredientes no digestibles (prebióticos) con la conclusión que ambos tienen efectos benéficos en cáncer colorrectal (CRC) (Fotiadis *et al.*, 2008; Wollowski *et al.*, 2001; Prebiotics, 2010). A pesar de la cirugía, seguida por quimio y radioterapia, la tasa de éxito del tratamiento CRC sigue variable con alta tasa de mortalidad (Liong, 2008).

Se ha demostrado que el crecimiento de bacterias que liberan enzimas carcinogénicas, se inhibe por bajo pH y probióticos (*L. acidophilus* y *B. bifidum*), se ha reportado pH bajo en heces fecales con baja proliferación de colonias en criptas (Fotiadis *et al.*, 2008; Biasco *et al.*, 1991). Una dieta alta en grasa es considerada factor de riesgo de CRC porque el colesterol es convertido a ácidos biliares primarios en el hígado con subsecuente ácido biliar secundario en el colon por la acción de 7 α -dehydroxylase bacteriana (Fotiadis *et al.*, 2008; Weisburger y Wynder, 1987).

Estos ácidos biliares secundarios (particularmente el ácido litocólico) son citotóxicos en el epitelio del colon e incrementan la proliferación de células intestinales (Fotiadis *et al.*, 2008; Bruce, 1987). Lidbeck *et al.* (1991), demostraron una baja concentración de ácidos biliares secundarios en heces por la administración de leches fermentadas suplementadas con *L. acidophilus*. Por lo tanto, el efecto protector de los probióticos frente al cáncer puede deberse a la propiedad de bajo pH en el colon como la reducción de la formación de los ácidos biliares secundarios (Fotiadis *et al.*, 2008). El pH del colon en personas sanas varía de 4.5 a 7 (Madigan *et al.*, 2004).

En su revisión sobre la prevención de cáncer de colon por probióticos, Brady *et al.*, 2000; recogen un total de 24 observaciones sobre probióticos y tumores de colon, incluyendo datos de principios de los 80, que describen la reducción por derivados lácteos fermentados por bacterias del ácido láctico, de la tumorigénesis experimentalmente inducida en ratas Brady *et al.* (2000); concluyeron que existen una serie de estudios, en modelos animales, probando una relación inversa entre el consumo de probióticos y aparición de criptas aberrantes o el desarrollo de tumores en el colon, así como evidencias sobre el sinergismo antitumoral del consumo de probióticos y prebióticos (fructo-oligosacáridos).

Hay algunos datos iniciales que indican que los microorganismos probióticos pueden impedir o retrasar la aparición de ciertos tipos de cáncer (Fig. 8). Esto se desprende del conocimiento de que los elementos que constituyen la microflora intestinal pueden producir sustancias carcinógenas como las nitrosaminas. Por consiguiente, la administración de lactobacilos y bifidobacterias podría teóricamente modificar la flora, dando lugar a una reducción de los niveles de enzimas pro-carcinogénicas como la nitroreductasa, azoreductasa (Mennickent y Green, 2009) y β -glucuronidasa y sustancias carcinógenas (Hosada *et al.*, 1996). Por otra parte, hay algunos indicios de que la instalación intestinal de probióticos, incluido *L. casei* Shirota, puede reducir las reapariciones del cáncer en otros sitios, como la vejiga urinaria (Aso *et al.*, 1995).

Estudios *in vitro* con *L. rhamnosus* GG y bifidobacterias y un estudio *in vivo* utilizando cepas GG y LC-705 de *L. rhamnosus*, así como *Propionibacterium sp*, demostraron una disminución de la disponibilidad de aflatoxina carcinógena en el lumen (El-Nezami *et al.*, 2000; Oatley *et al.*, 2000).

Matsumoto y Benno (2004) realizaron un estudio con voluntarios humanos, demostrando que el consumo de yogurt conteniendo *B. lactis* LKM512 incrementa el contenido fecal en espermidina y disminuye la mutagenicidad de las heces; los autores especulan que la espermidina producida por estas bacterias podría jugar un papel como estabilizador del DNA celular, al que protegerían de los efectos

genotóxicos de los carcinógenos. Los ácidos grasos de cadena corta también son candidatos, en especial el butírico, por sus efectos protectores sobre los enterocitos (Fig. 8) (Wong *et al.*, 2006).

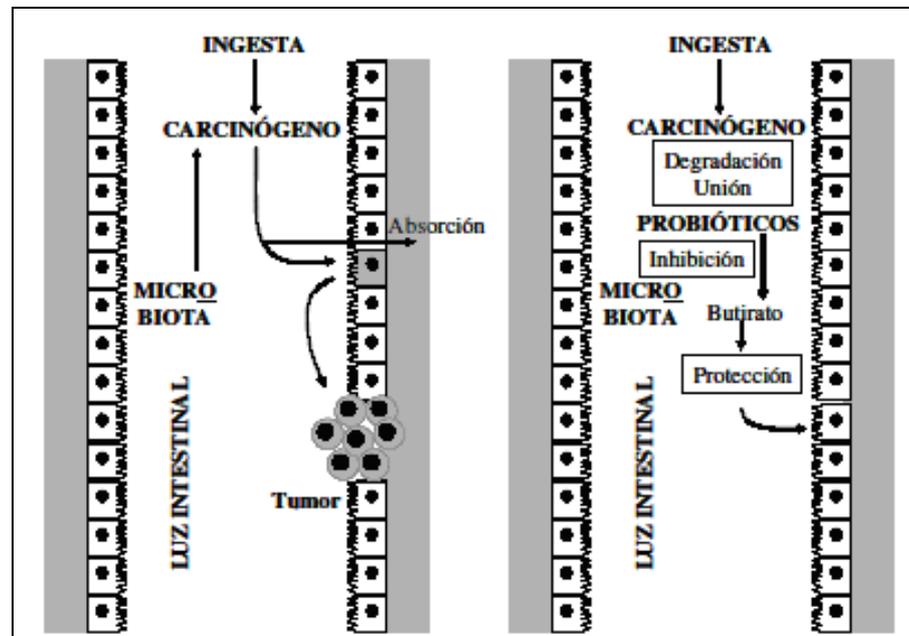


Fig. 8. Mecanismos directos de acción antitumoral atribuidos a microorganismos probióticos (imagen tomada de Bujalance, 2006).

Durante las últimas 2 décadas, algunos estudios animales han demostrado el efecto de protección de probióticos en cáncer colorrectal. En la administración de probióticos a ratas ha sido encontrada baja incidencia de lesiones precancerosas (focos de criptas aberrantes FCA) en el colon (Rowland, 2008). FCA es conocido porque precede la neoplasia colorrectal, la medida de su desarrollo es útil para predecir la existencia de cáncer colorrectal. Usando azoxymetano (AOM) se induce la formación de FCA en ratas. A este respecto, Reddy *et al.* (1997) reportaron que un mayor crecimiento de bifidobacterias en el colon, lo cual puede resultar en la inhibición del desarrollo de FCA y multiplicidad de las criptas, lo cual fue atribuido a la reducción de pH por colonias de microorganismos que fueron responsables de inhibir el crecimiento de *E. coli* y *Clostridium*.

Kulkarni y Reddy (1994) reportaron que bajo un esquema de alimentación con *Bifidobacterium longum*, se presentaba una inhibición en la formación de FCA en el 50% de ratas tratadas. Una investigación similar realizada por Challa *et al.* (1997) demostró una reducción del 23% en total colonización de FCA y un 28% en total de cripta aberrante (AC) en ratas con una dieta que contenía 0.5% de *B. longum* (1×10^8 células viables/g de alimento). A los animales se les dio la dieta experimental anterior al tratamiento con AOM y durante el experimento.

Ciertos xenobióticos mutagénicos, después de la absorción, son detoxificados en el hígado por conjugación con ácido glucurónico y son de nuevo liberados en el intestino como glucurónicos conjugados.

En el tracto gastrointestinal, bacterias como enterobacterias y clostridios causan regeneración (liberación) de aglicones tóxicos mutagénicos *de novo* de los conjugados de la liberación de enzimas como β -glucuronidasa, nitroreductasa y azoreductasa (Fotiadis *et al.*, 2008; Wollowski *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha encontrado que ciertas cadenas de lactobacilos y bifidobacterias disminuyen la concentración y actividad de estas enzimas xenobióticas metabolizantes y es probable que reducen el nivel de lesión preneoplásica o tumor en el tracto gastrointestinal (Fotiadis *et al.*, 2008; Wollowski *et al.*, 2001; Burns y Rowland, 2000). Por lo mismo se ha propuesto que la actividad anticancerígena de los probióticos puede ser debido a la inactivación de las enzimas bacterianas intestinales procarcinogénicas (Liong, 2008; Geier *et al.*, 2006).

Baricault *et al.* (1995) estudiaron el efecto de diferentes leches fermentadas en células de cáncer de colon usando una línea celular de células de cáncer de colon humanas (HT-29). Para la leche fermentada, utilizaron cepas de *L. helveticus*, *Bifidobacterium*, *L. acidophilus* o una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Los resultados demostraron una disminución en el crecimiento de 10-50% de las células HT-29 tratadas.

A partir de una investigación en ratas, Singh *et al.* (1997) llegaron a la conclusión de que AOM inducido por la proliferación celular se inhibe con la ingestión de *B. longum* a través de una disminución de la ornitina descarboxilasa (ODC). Como ODC está involucrada en la biosíntesis de poliaminas que ayudan en la célula a la proliferación, diferenciación y síntesis de macromoléculas, concluyeron que se mejora la actividad de la ODC con un estado de hiperproliferativo de la mucosa del colon que puede llevar a adenomas de colon y carcinomas. También encontraron una expresión baja de la oncoproteína ras-p21 cuando las ratas fueron alimentadas con *B. longum* (Singh *et al.*, 1997).

Se ha observado que la descomposición anaerobia de prebióticos y su subsecuente fermentación por probióticos no solo promueve su crecimiento, sino también conduce a la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) como butirato, acetato y propionato y varias cantidad de bioproductos de fermentación. Estos SCFAs disminuyen el pH del colon, el cual contribuye a la acción anticáncer (Wollowski *et al.*, 2001).

El butirato de sodio es un SCFA que tiene efectos a nivel molecular, celular y tisular. Es conocido por ser un inhibidor de la deacetilasa de histonas (HDACs). En las células, el butirato de sodio modifica la expresión de un grupo de genes que contienen elementos de respuesta al butirato. El butirato de sodio también induce la detención del crecimiento, diferenciación y apoptosis de células cancerosas, principalmente por su efecto sobre la actividad del HDAC (Domokos *et al.*, 2010; Garczarczyk *et al.*, 2010). Además, suprime la inflamación, en parte reduciendo la expresión de citoquinas pro- inflamatorias como el interferon- γ , la interleucina (IL)-6 y la IL-1 β por medio de la inhibición específica de la ruta NF- κ B (Kim *et al.*, 2004).

La presencia de butirato en el intestino delgado puede ser un factor esencial en el mantenimiento y reparación de la mucosa (Wächtershäuser y Stein, 2000). El butirato propicia efectos sistémicos indirectos, como la instilación de los SCFAs

en el colon que estimula la proliferación de células no solo en la mucosa del colon sino también en tejidos no expuestos, como el epitelio del colon adyacente, el íleon o el yeyuno. El butirato aumenta la producción de hormonas enterotrópicas, y estimula el sistema nervioso entérico (Rombeau *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1998). El butirato estimula la secreción de enzimas digestivas en el tracto gastrointestinal y en el páncreas. Además de su actividad antineoplásica, el butirato de sodio induce cambios en la morfología celular, modifica la expresión de genes celulares, regula la acción hormonal y los receptores de hormonas, así como los receptores de los factores de crecimiento (tomado de www.norel.es).

El colon humano absorbe una cantidad significativa de ácidos grasos de cadena corta. Estos tienen un pKa alrededor de 4,8 y están ionizados en más del 99% dado el pH que normalmente existe en el colon. Son rápidamente absorbidos por el epitelio del colon y permanecen en el lumen solo en pacientes que sufren un sobrecrecimiento bacteriano. Normalmente, menos de un 10% del total de los ácidos grasos de cadena corta producidos se pierden en las deposiciones. La absorción de los AGCC ionizados se produce por medio de un transportador electrogénicamente neutro, por intercambio de iones: $\text{HCO}_3^-/\text{AGCC}$. Estos transportadores existen en el ribete y en la membrana basolateral de los colonocitos. La absorción de AGCC estimula la absorción de Na^+ , K^+ y agua. Este proceso significa, además, una conservación de energía considerable (tomado de escuela.med.puc.cl).

Células de colon tratadas con butirato son protegidas contra el daño de oxidación por peróxido de hidrógeno que las células que no son tratadas. En células de colon, se ha observado que el butirato incrementa la formación de glutatión S-transferasa, la cual es una enzima importante involucrada en la detoxificación de productos electrofílicos y compuestos asociados con estrés oxidativo (Wollowski *et al.*, 2001).

Recientes evidencias sugieren que el butirato puede inhibir la actividad genotóxica de nitrosaminas y de peróxido de hidrógeno en células de colon humanas. En humanos, la ingestión de probióticos han disminuido la concentración de sustancias genotóxicas en orina y también con altos niveles de compuestos que inducen oxidación de bases de DNA (Wollowski *et al.*, 2001).

Los probióticos incrementan la secreción de moco que previene adherencia y colonización de bacterias patógenas a lo largo de la pared intestinal y cierra la barrera por la disminución de la permeabilidad, esto previene la entrada de patógenos y alérgenos al torrente sanguíneo (Fig. 9) (<http://www.vitamintrader.com/articles/the-absolute-importance-of-probiotics/> accesado 4/oct/2013).

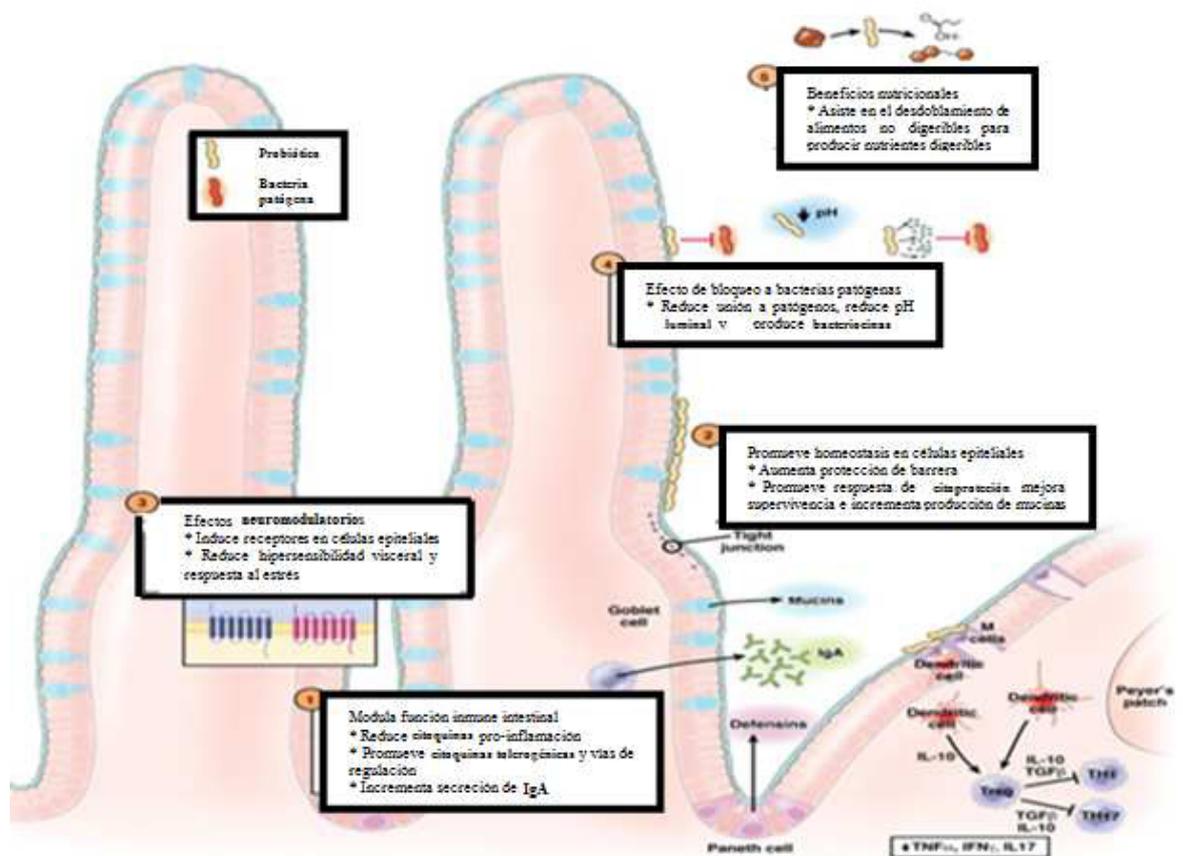


Fig. 9. Interferencia entre bacterias adheridas a las células epiteliales del intestino. La actividad de los probióticos es por la secreción de ácidos orgánicos, surfactantes y agentes antimicrobianos (tomado de Matthew, 2012).

Aunque los probióticos promueven el crecimiento de bacterias benéficas no patógenas al reducir el pH del colon, algunos de ellas también producen sustancias como bacteriocinas y antitoxinas, que inhiben las bacterias patógenas (Gupta y Garg, 2009 y <http://www.vitamintrader.com/articles/the-absolute-importance-of-probiotics/>). Además, se ha encontrado que liberan metabolitos protectores al intestino y regulan la motilidad intestinal (Gupta y Garg, 2009). Se ha discutido anteriormente que algunas cepas probióticas también pueden prevenir el daño genotóxico para el epitelio del colon (que se considera ser una etapa temprana del proceso carcinogénico).

Muchos de los carcinógenos transmitidos por los alimentos como aminos heterocíclicos y los hidrocarburos aromáticos policíclicos se inactivan por la conjugación con glutatión con la ayuda de la enzima glutatión S-transferasa (GST), que se encuentra en el hígado y otros tejidos incluyendo intestinal (Burns y Rowlan, 2000). Otras investigaciones han postulado que los probióticos poseen efectos protectores contra el cáncer de colon cambiando el proceso de diferenciación de las células tumorales.

2.5.1. Tratamiento para cáncer de colon y recto

Se pueden usar varios medicamentos para tratar el cáncer colorrectal. A menudo, se combinan dos o más de estos medicamentos para tratar que éstos sean más eficaces. El tratamiento se puede administrar de diferentes maneras:

Quimioterapia sistémica: la quimioterapia sistémica utiliza medicamentos que se suministran por una vena o por vía oral. Estos medicamentos ingresan al torrente sanguíneo y llegan a todas las áreas del cuerpo, haciendo que este tratamiento sea útil contra los tumores que se han propagado (metástasis) más allá del órgano en el cual se originaron.

Quimioterapia regional: en la quimioterapia regional, los medicamentos se inyectan directamente en una arteria que llega hasta la parte del cuerpo que contiene el tumor. Este método concentra la dosis de quimioterapia alcanzando así las células cancerosas. Además, reduce los efectos secundarios al limitar la cantidad que alcanza el resto de cuerpo. La quimioterapia se puede usar en fechas distintas durante el tratamiento de los cánceres de colon o de recto.

Quimioterapia adyuvante: se usa después de la cirugía para remover el cáncer se le conoce como quimioterapia adyuvante. Este tratamiento puede ayudar a evitar que el cáncer regrese y ha demostrado que ayuda a las personas con cáncer de colon y recto en etapa II y III a vivir por más tiempo. Se administra después de remover todo el cáncer visible para reducir la probabilidad de que regrese. Este tratamiento funciona al destruir el pequeño número de células cancerosas que haya podido quedar al momento de la cirugía, ya que eran tan pequeñas que no se podían ver. La

quimioterapia adyuvante también tiene el objetivo de destruir las células cancerosas que pudieran haber escapado del tumor primario y alojarse en otras partes del cuerpo (pero que son tan pequeñas que no se pueden observar en los estudios por imágenes).

La quimioterapia neoadyuvante: sólo para algunos tipos de cáncer, se administra (junto con la radiación) antes de la cirugía para tratar de reducir el tamaño del cáncer y así hacer más fácil la cirugía. A esto se le conoce como tratamiento neoadyuvante y a menudo se usa en el tratamiento del cáncer rectal.

La quimioterapia para los cánceres avanzados también se puede usar para ayudar a encoger tumores y a aliviar los síntomas de los cánceres que se han propagado a otros órganos, tal como el hígado. Aunque resulta poco probable que cure el cáncer, a menudo ayuda a las personas a vivir más tiempo.

Los medicamentos de quimioterapia son muy potentes, y pueden afectar algunas células sanas en el cuerpo. Los doctores administran los medicamentos en ciclos, con cada período de tratamiento seguido de un período de descanso para permitir que su cuerpo se recupere. Los ciclos de quimioterapia por lo general duran alrededor de 2 a 4 semanas, y las personas reciben usualmente al menos varios ciclos de tratamiento. Los medicamentos que se usan con más frecuencia para el cáncer colorrectal son:

- A) 5-fluorouracilo (5-FU), el cual a menudo se administra con el medicamento parecido a vitaminas, leucovorín, (también llamado ácido folínico), lo que mejora su eficacia.
- B) Capecitabina (Xeloda®), el cual se administra en forma de pastilla. Una vez que está en el cuerpo, este medicamento cambia a 5-FU cuando alcanza el lugar del tumor.
- C) Irinotecán (Camptosar®)
- D) Oxaliplatino (Eloxatin®)

Los efectos secundarios de la quimioterapia dependen del tipo y dosis de los medicamentos administrados, así como de la duración del tiempo que se administran. Los efectos secundarios comunes de los medicamentos pueden incluir:

- Caída del cabello
- Llagas en la boca
- Falta de apetito
- Náusea y vómito
- Bajos recuentos sanguíneos
- Probabilidad de infecciones (por bajos niveles de glóbulos blancos)
- Moretones o presentar sangrados (por bajos niveles de plaquetas)

Además de estos efectos, ciertas medicinas causan algunos efectos secundarios específicos, por ejemplo: síndrome de pies y manos, neuropatía y diarrea (tomado de www.cancer.org accesado 4/octubre/2013).

Cordero y Aristizábal (2002) y Parra y Aristizábal (2011) realizaron experimentos con doxorubicina HCl como control negativo de proliferación celular de HT-29, donde la línea celular mostró ser sensible al antineoplásico de manera *in vitro*.

2.6 Estrategias terapéuticas

Existen tres estrategias alimentarias que promueven el mantenimiento de un equilibrio más saludable de la microflora intestinal, consistentes en la alteración beneficiosa de su composición, mediante el incremento de las cantidades de bifidobacterias, de lactobacilos o de ambos basadas en la utilización de prebióticos, probióticos y simbióticos. Los probióticos son microorganismos vivos reconocidos como habitantes normales del intestino humano que, al ser ingeridos, potencian las propiedades de la flora intestinal.

Los prebióticos son ingredientes alimentarios (hidratos de carbono no digeribles) que poseen un efecto favorable sobre la flora intestinal ya que estimulan

selectivamente el crecimiento de bacterias benéficas. Los simbióticos son la combinación de pre y probióticos (Hertzler, 1996 y 2003).

Tanto los prebióticos como los probióticos son considerados alimentos funcionales, y se definen, como aquellos que contienen un componente, sea o no un nutriente, que afecta una o varias funciones del organismo en forma específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico que va más allá de su valor nutritivo tradicional de acuerdo a los recientes lineamientos de la OMS. Las estrategias terapéuticas actuales deben tomar en cuenta una terapia de interferencia microbiana, es decir, que permita mantener o restablecer un estado de salud mediante la introducción en el huésped de microorganismos vivos que permitan estabilizar el equilibrio de la flora intestinal.

En el campo de los derivados lácteos, después de varios años de investigación, ha salido al mercado lo que se llama los "cultivos biológicos" los cuales se diferencian de los tradicionales en que sobreviven el paso del estómago al intestino, y una vez allí son asimilados por el organismo, de forma que además de su alto valor nutritivo, poseen adicionalmente un importante carácter terapéutico. Este tipo de cultivo está compuesto por dos clases de bacterias, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* las cuales forman una asociación altamente productiva.

Es importante tener en cuenta que las bifidobacterias ingeridas con yogurt o sus compuestos estarán más protegidas de la acción de los jugos gástricos, asegurando su llegada al intestino. Se considera que la dosis diaria de bifidobacterias que debe ser ingerida para mantener una dominancia en el intestino es de 10^8 a 10^9 , en estas concentraciones se puede asegurar un efecto terapéutico.

Cuando el ser humano ingiere productos que contengan estas bacterias, éstas encuentran un hábitat adecuado en el intestino, y permanecen viables bajo condiciones normales. Ambos microorganismos son resistentes a sales biliares y a los pH bajos, condiciones normales en el paso por el estómago e intestino. En el

caso de los derivados lácteos que contienen las bacterias tradicionales, hay únicamente un aporte nutritivo, ya que generalmente vienen pasteurizados o han sido guardados a bajas temperaturas y ellas requieren una temperatura de más de 37° C para mantenerse vivas. No así cuando están liofilizadas, todavía en el empaque de la farmacia, entonces deben estar a 4° C y en algunas presentaciones (mesófilos, termófilos y otras para la industria), bajo 0°C. Las "bacterias biológicas" pueden adicionarse a la leche fresca o a sus derivados, convirtiéndolos así, en alimentos altamente nutritivos y terapéuticos. Este descubrimiento implica un paso gigante en el campo de la biotecnología, el cual debe darse a conocer a todos los niveles, desde los industriales, hasta los consumidores, pasando por los profesionales de la salud.

Pocos estudios han sido publicados apoyando la hipótesis de que la terapia del tipo prebiótico o probiótico, pudieran ser efectiva en el tratamiento de estas condiciones: *B. longm* empleando como probiótico, han logrado prevenir una translocación de bacterias (Ondarza, 2007). Las bifidobacterias y otras cepas de bacterias benéficas son estimuladoras de la síntesis de IgA. Por ello, se ha relacionado el consumo de ciertos alimentos prebióticos, que contienen estas cepas de bacterias, con una estimulación de las defensas (Mateos, 2002).

En trabajos recientes, se ha reportado la actividad inhibitoria de los factores extracelulares de varios probióticos sobre cultivos axénicos *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS (Barrón *et al.*, 2008; Zamora, 2008), *Giardia lamblia* (Calderón, 2011, Ontiveros, 2011) y *Trichomonas vaginalis* (Ontiveros, 2011), así como en las bacterias *Salmonella sp*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocitógenes*, *Serratia marscecens* (García, 2011). Estos resultados brindan la posibilidad de realizar experimentos empleando únicamente los metabolitos producto de los probióticos.

3. HIPÓTESIS

Los factores extracelulares de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum* presenten interferencia microbiana sobre la línea celular HT-29 de cáncer colorrectal en humano.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar la interferencia microbiana de factores extracelulares de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum* sobre la línea celular HT-29 de cáncer colorrectal en humano.

4.2 Objetivos Específicos

- Establecer el tiempo de producción de factores extracelulares mediante cinéticas de crecimiento de los probióticos *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum*.
- Determinar la interferencia microbiana de los factores extracelulares de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* sobre la línea celular HT-29 de cáncer colorrectal humano.
- Determinar la actividad citotóxica de los factores extracelulares de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* sobre leucocitos humanos.
- Determinar la concentración inhibitoria media de los factores extracelulares.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Material biológico

- A) Línea celular HT-29
- B) Leucocitos
- C) Probióticos
 - *Lactobacillus casei*
 - *L. plantarum*
 - *L. acidophilus*
 - *Bifidobacterium longum*

La línea celular y los probióticos se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection, 1994). Los leucocitos se obtuvieron de sangre donada por estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

5.2 Preparación de soluciones y medios de cultivo

La preparación de las soluciones y medios de cultivo que se emplearon en el desarrollo de este trabajo se describen en el anexo I.

5.3 Probióticos

5.3.1 Preparación de medio de cultivo MPT-caldo y MPT-agar: se preparó de acuerdo a las indicaciones mencionadas por Barrón *et al.*, 2008.

5.3.2. Mantenimiento: Las cepas de probióticos se mantienen en refrigeración a 4°C en MPT-caldo, cada cepa se activa tomando 500µL y se suspende en 5mL de MPT-caldo, se incuban por 24-48h a 37°C. Para la activación de cada cepa de bacterias y mantenimiento de las mismas, se toman bajo condiciones de esterilidad 0.5mL del cultivo de la cepa de las bacterias ácido lácticas en tubos borosilicato de 13x100mm conteniendo 5mL de MPT-caldo, se incuban a 37°C/18 h, posteriormente bajo condiciones de esterilidad se toman una asada de cada cultivo y se resembran por estría en tres tubos de borosilicato de 13x100mm conteniendo 5mL de MPT-agar inclinado, se incuban a 37°C/24 h, enseguida se guardan a 4°C por no más de tres meses.

5.4 Cinética de crecimiento

5.4.1 Método turbidimétrico: Se dispuso para cada de una de las cepas de probióticos, nueve tubos con tapón de rosca conteniendo 5mL de MPT-caldo, y frente al mechero, se inocularon con 500µL de cultivo de cada uno de los probióticos, e inmediatamente se tomó la primera lectura. Posteriormente se incuban en un baño de agua a 37°C y cada hora se realizaron las lecturas de absorbancia empleando un espectrofotómetro (Spectronic Genesis®) a una longitud de onda de 635nm durante un lapso de 24 h, se registró y se graficaron los valores obtenidos.

5.4.2 Método de recuento bacteriano en placa (RBP): Se reactivaron las bacterias probióticas, tomando una asada de una colonia del cultivo en MPT-agar y se depositaron en tres tubos de 13x100mm conteniendo 5mL de MPT-caldo, se procedió a incubar a 37°C durante 24h, transcurrido este tiempo se inocularon tres tubos de 13x100mm con 5mL de MPT-caldo con un inóculo al 1% y se incubaron a 37°C/24 h, después se inocularon 1% de cultivo en otros tres tubos de 13x100mm con 5mL de MPT-caldo con un inóculo de 1% y se incubaron a 37°C/14h, transcurrido este tiempo se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC)/mL empleando el método de dilución en placa; para realizar esta determinación se realizaron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-15} . A partir de las últimas diez diluciones se transfirieron 1 mL a una caja Petri enseguida se agregaron 15mL de MPT-agar, inmediatamente se giró la placa suavemente haciendo figuras de ochos invisibles en la mesa, esto para distribuir homogéneamente el inóculo a través del medio agar, se dejó solidificar, posteriormente se incubó a 37°C por 24h, después de este tiempo se contaron las colonias para determinar la cuenta de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

5.5 Obtención de factores extracelulares de probióticos: Los probióticos se reactivan antes de e iniciar cada bioensayo. A un litro de MPT-caldo se le inoculó 1% de cultivo de cada uno de los probióticos (incubado por 24h a 37°C dependiendo de

cada cepa) se incubó a 37°C por 24 h. El cultivo se colocó en frascos especiales y se centrifugó a 2500rpm por 10 min, se separó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente; este paso se repite hasta que se observe la ausencia del precipitado; el sobrenadante se esterilizó con filtración cuatro veces con filtros Millipore de 0.22µm, se le realizó la prueba de esterilidad, tomando una alícuota y colocándola en MPT-caldo para probióticos, se incubó a 37°C por 24 h y una vez aprobada dicha prueba de esterilidad, el sobrenadante estéril fue el medio con los factores extracelulares de los probióticos.

5.6 Obtención del liofilizado de los factores extracelulares (LFE) de probióticos: El sobrenadante filtrado se congeló por 24 h a -20°C y posteriormente se llevó la muestra de los factores extracelulares de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum* a un liofilizador. El liofilizado que se obtuvo se colocó en un frasco de vidrio estéril y se almacenó a -20°C hasta su empleo.

5.7 Línea celular.

5.7.1 Mantenimiento *in vitro*: Las células tumorales se mantuvieron en el medio AIM-V suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda, con un 5% de CO₂ en frascos de 25cm³.

5.7.2 Congelación de la línea celular: Para asegurar la disponibilidad de la línea en el laboratorio, se congelaron muestras (stocks) de aproximadamente 2x10⁷ cél/mL, para lo cual las células se concentraron mediante centrifugación a 1800 rpm durante 10min, se eliminó el sobrenadante y el concentrado celular se resuspendió en una solución de 70% medio AIM-V, 20% suero fetal bovino (SFB) y 10% DMSO como anticongelante que impide la formación de cristales de agua en el interior de las células manteniendo la integridad celular, y se dispensó 1mL por criotubo (Corning), este material se almacenó

a -80°C durante una semana y después se guardó en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento que fueran requerido.

5.8 Valoración de actividad biológica: Las células HT-29 de cáncer de colon humano que se encuentren en crecimiento exponencial, con un 90% de confluencia, trataron con una solución de tripsina 0.025%-EDTA 0.03% durante 15 minutos a 37°C, para obtener una suspensión celular que se contaron en cámara de Neubauer, empleando el método de exclusión del colorante azul de trypan. Se inocularon 5×10^4 células de cáncer de colon humano en placas de 96 pozos con fondo plano. Las placas se preincubaron por 24 h a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de aire, por 24 h, para permitir adherencia de las células en los pozos. Se realizaron diluciones seriadas 1:2 de la solución madre (430 mg/mL) de LFE de cada probiótico sobre las placas de 96 pozos de fondo plano, ajustando un volumen de 100 µL, incubando por un periodo de 48 h a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de aire. Además, se dejaron pozos con células mas medio AIM-V, como control positivo de crecimiento, como control negativo de crecimiento se utilizó Doxorubicia HCl y pozos sin células, pero con tratamiento como blancos (ver Fig. 10).

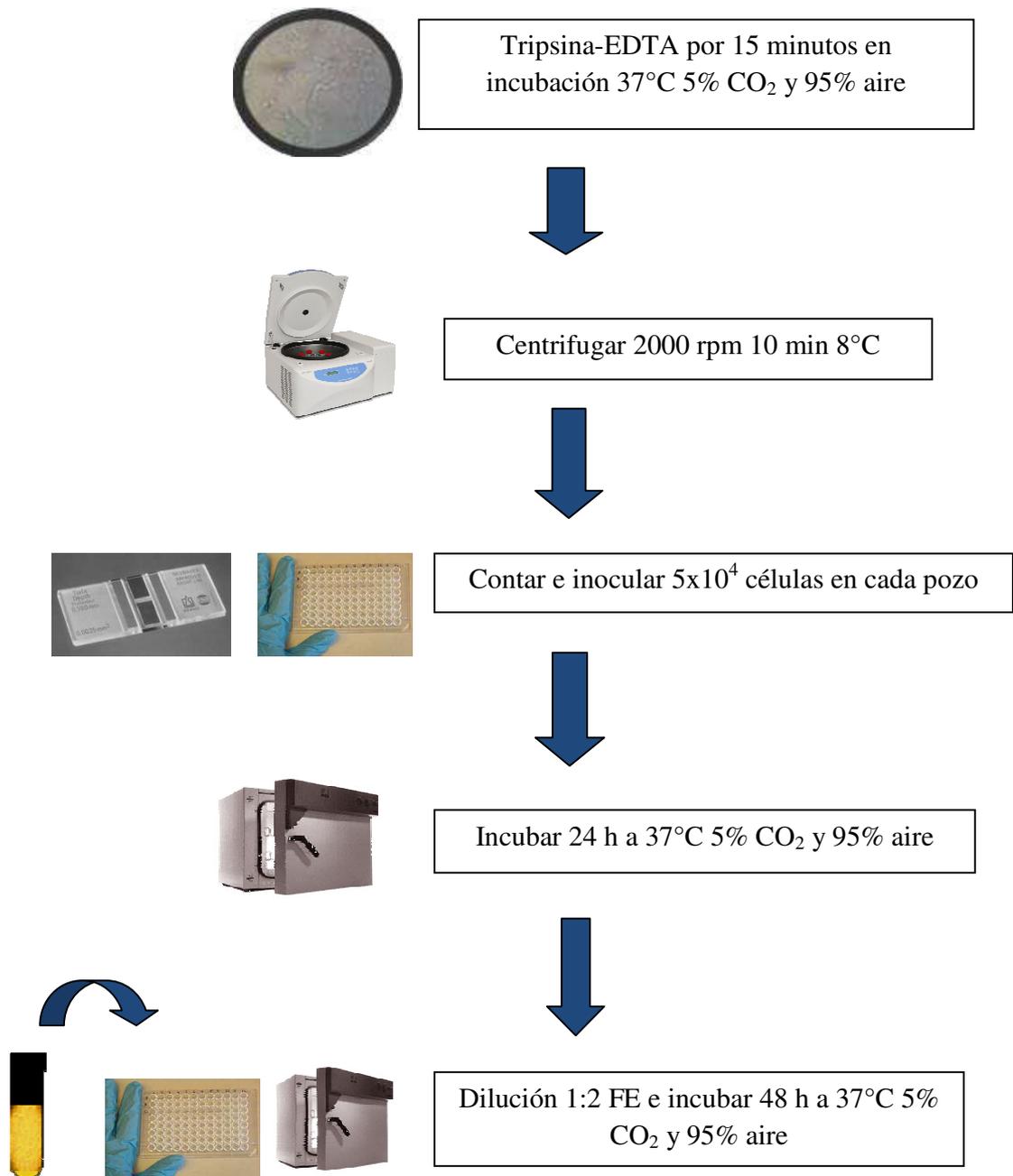


Fig. 10. Diseño experimental de valoración de actividad biológica. Procedimiento para medir la actividad biológica de los FE sobre la línea celular HT-29

Para evaluar el efecto citotóxico de los LFE de las cepas probióticas, se empleó el método fluorométrico indirecto de reducción del MTT, se agregó a cada pozo 15 μ L de MTT (0.5 mg/mL), se incubó por cuatro horas y posteriormente se agregó a cada pozo 80 μ L de DMSO y se tomó lectura a 570 nm de absorbancia (ver Fig. 11).

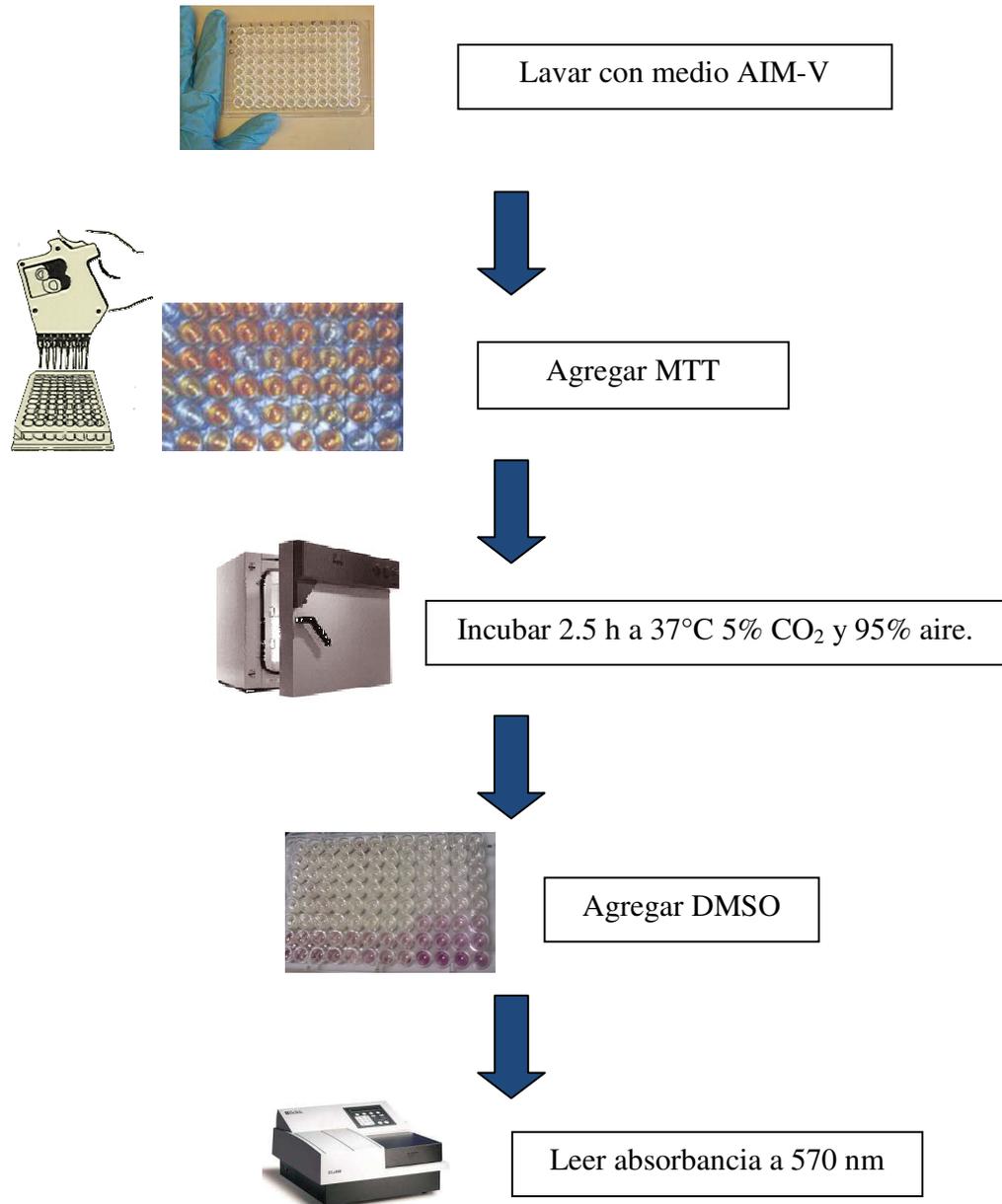


Fig. 11. Método del MTT. Método estandarizado para determinar la viabilidad celular.

5.8.1 Valoración citotóxica de leucocitos: Para evaluar si los LFE de las cepas probióticas son citotóxicos a las células mononucleares periféricas de la sangre humana, se obtuvieron cerca de 60mL de sangre de cuatro personas. La sangre fue mezclada con solución salina 0.85% y posteriormente se transfirió a tubos con Ficoll-Paque lentamente por la paredes y después pasó a centrifugación a 3000 rpm por 30 minutos.

La interfase blanca que se observó, son los leucocitos, los cuales se tomaron y transfirieron a otros tubos con solución salina 0.85% y se volvió a centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos. Después se resuspendieron en medio AIM-V y se ajustó el volumen a 1×10^6 células/mL. En una microplaca de 96 pozos, se agregaron 100 μ L de los LFE (las mismas 8 concentraciones que se utilizaron en el experimento con HT-29) y 100 μ L de células en 24 pozos de cada probiótico. Se utilizó también un control, el cual fue los LFE + leucocitos + concavalina A (ConA); este último se utilizó como mitógeno. Se usó la misma metodología a excepción al cultivar en la microplaca de 96 pozos, ahí en cada pozo se agregó 100 μ L de medio AIM-V, 80 μ L de células y 20 μ L de ConA. Asimismo hubo un tratamiento blanco el cual fue medio AIM-V y leucocitos; y, medio AIM-V con leucocitos y ConA. Se incubó por 48 horas y se utilizó el método del MTT para evaluar el efecto citotóxico, en las mismas condiciones que se usó para la HT-29.

5.9 Análisis estadístico

Para determinar el efecto de los LFE de probióticos sobre el crecimiento de las líneas celulares HT-29 se realizaron los siguientes análisis:

- Análisis estadístico de los resultados obtenidos de la actividad biológica de los LFE con el paquete estadístico SPSS para Windows® versión 2000 y se determinó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de los LFE mediante un análisis Probit.
- ANOVA $P < 0.05$ con una posterior comparación múltiple de medias.

6. RESULTADOS

6.1 Cinética de crecimiento

En la Fig. 12 se observa la gráfica correspondiente a la cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum* por el método turbidimétrico. La fase de adaptación ocurrió hasta la tercera hora, en las cuatro cepas probióticas el comportamiento fue similar. Para *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum* la fase exponencial fue a partir de la tercera hora hasta la novena hora, y después se presentó la fase estacionaria. Para *L. acidophilus* la fase exponencial fue a partir de la tercer hora hasta la séptima hora; esta cepa fue la que más rápido llegó a su fase estacionaria y obtuvo una lectura de absorbancia menor de 1.2nm; en contraste *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum* la lectura de absorbancia para su fase estacionaria fue de 1.6nm. Entre las cuatro cepas probióticas no hubo diferencias significativas.

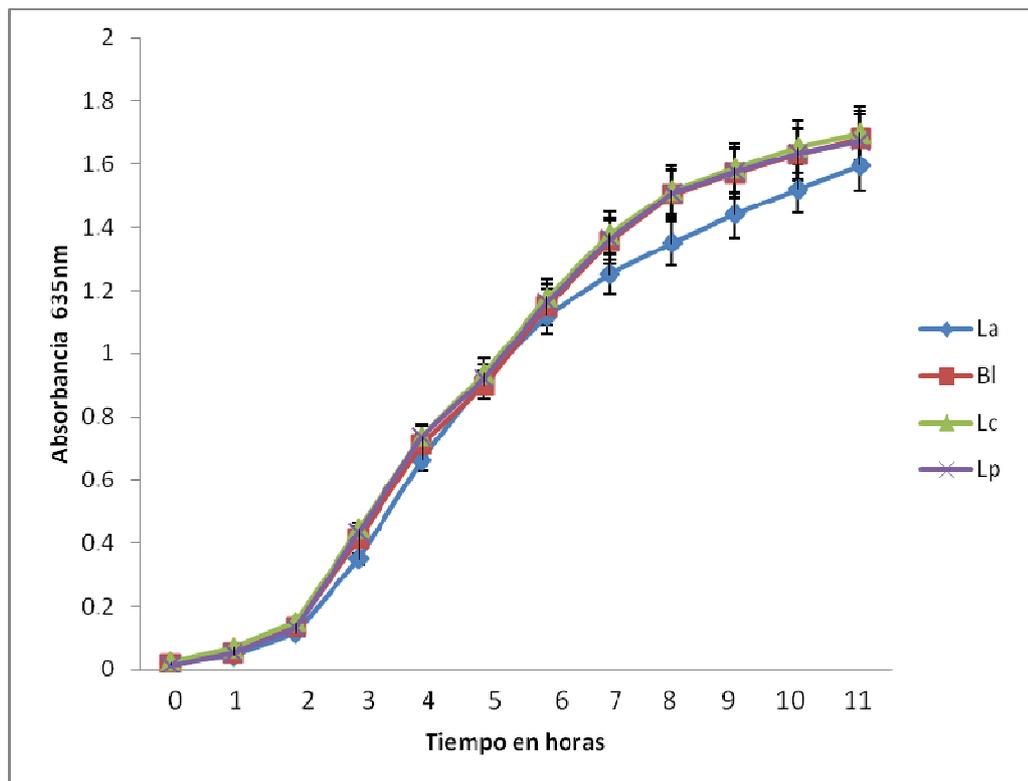


Fig. 12. Gráfica de la cinética de crecimiento de las bacterias probióticas.
 La cinética de crecimiento se llevó a cabo durante 12 horas mediante el método turbidimétrico.

6.2 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Después de 12 horas de incubación a 37°C, se realizó el recuento bacteriano en placa (RBP) para determinar las unidades formadoras de colonias. En la Fig. 13 se muestran los resultados de las UFC de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum*. Entre las cuatro cepas hubo una marcada diferencia significativa, siendo *L. acidophilus* la que mostró un mayor número de UFC (652.66×10^9) seguido por *L. plantarum* (89.33×10^9), *B. longum* (59×10^9) y *L. casei* con el menor número (35.33×10^9).

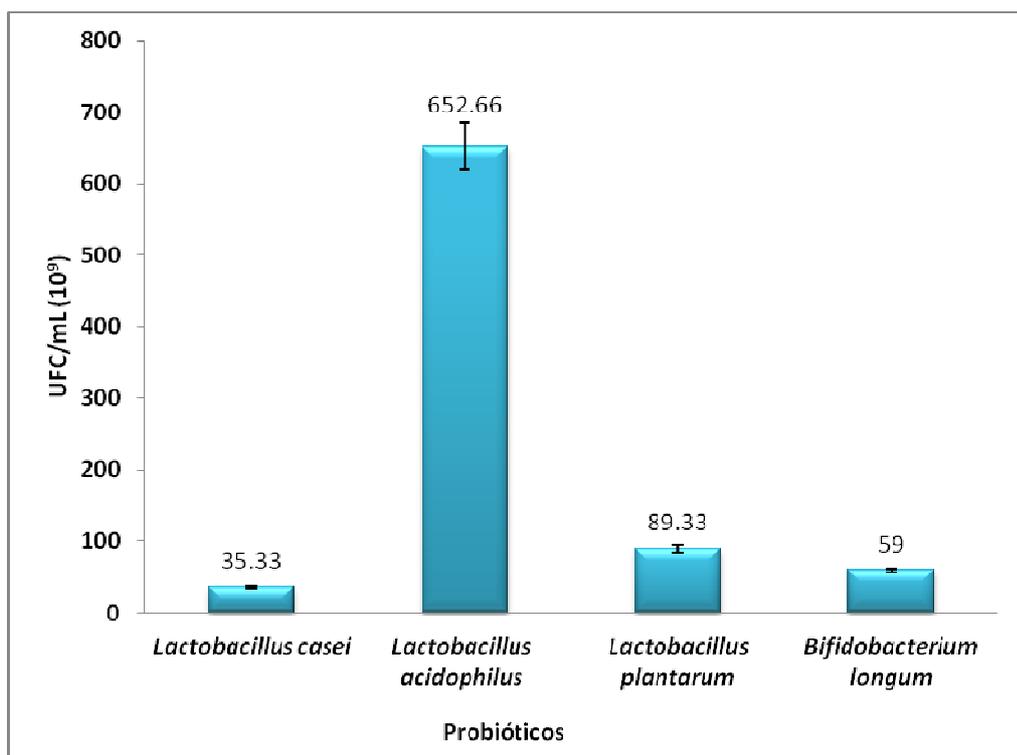


Fig 13. Resultado de las UFC de las bacterias probióticas. *L. acidophilus* mostró el mayor número de UFC seguido por *L. plantarum*, *B. longum* y *L. casei*, se observó que hubo gran diferencia significativa de *L. acidophilus* con respecto a las otras tres cepas.

6.3 Liofilizados de factores extracelulares (LFE)

Las características de los LFE de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum* se describen en la Tabla 3 y se observan en la Fig. 14.

Tabla 3.
Características de los LFE de las cepas probióticas

	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. longum</i>
pH	4.36	4.37	4.70	4.46
Color	café	rojo	amarillo	marrón
Textura	líquido	pegajoso	granulado	pegajoso
Rendimiento g/L	20	14	12	12



Fig. 14. Los LFE de las cepas probióticas. Aspecto de los LFE al finalizar el proceso de liofilización, los cuales presentaron diversos aspectos desde granular hasta pegajoso.

En los LFE, de las cuatro cepas probióticas, hubo un rango de pH de 4, siendo *L. casei* con el menor pH, de 4.36, esta misma cepa fue la que obtuvo un color más oscuro, textura líquida y el mayor rendimiento, de 20g/L. *L. plantarum* obtuvo un pH de 4.37, coloración roja, textura pegajosa y rendimiento de 14g/L. *L. acidophiuls* tuvo un pH de 4.70, el cual fue el mayor de las otras cepas; color amarillo con textura granulada y rendimiento de 12g/L. *B. longum* obtuvo un pH de 4.46, coloración marrón, textura pegajosa y rendimiento de 12 g/L. Las cepas de *L. acidophiuls* y *B. longum* fueron las que presentaron menor rendimiento.

6.4 Actividad biológica de los LFE sobre HT-29

En la Tabla 4 se muestran las absorbancias (570nm) de HT-29 frente a LFE de las cepas probióticas, asimismo el grupo control (células sin tratamiento). Fueron 3 eventos independientes donde las células HT-29 fueron incubadas 48 horas con las ocho diferentes diluciones de los LFE, y posteriormente, se utilizó el método turbidimétrico del MTT para analizar la viabilidad de la línea celular.

Tabla 4
Determinación de la interferencia microbiana de los LFE sobre HT-29

[mg/mL]	Liofilizados de factores extracelulares de:				Control
	<i>L. casei</i> ** (nm)	<i>L. plantarum</i> ** (nm)	<i>L. acidophilus</i> * (nm)	<i>B. longum</i> ** (nm)	
430	0.08	0.07	0.07	0.07	0.36
215	0.06	0.06	0.07	0.07	
107	0.06	0.06	0.07	0.07	
53	0.06	0.06	0.07	0.07	
26	0.07	0.07	0.06	0.07	
13	0.10	0.11	0.078	0.09	
7	0.27	0.21	0.19	0.39	
3.5	0.36	0.45	0.29	0.28	

*Diferencia significativa contra el grupo control

** Diferencia significativa contra el grupo control, pero igualdad entre tratamientos

Entre LFE de las cuatro cepas probióticas se observa que en las diluciones de 430mg/mL a 26 mg/mL hay semejanza en las lecturas de absorbancia. En las diluciones de 13mg/mL a 3 mg/mL, LFE de *L. acidophilus* tuvieron un comportamiento distinto, ya que se obtuvieron números más bajos, esto indica que a estas concentraciones hubo mayor inhibición del crecimiento de la línea celular HT-29. *L. acidophilus* tuvo diferencia significativa con las otras tres cepas, y las cuatros tuvieron diferencia significativa con el grupo control (células sin tratamiento).

Por otra parte, la Tabla 5 muestra los resultados del control negativo de proliferación celular, en el cual se utilizó doxorrubicina HCl a diferentes concentraciones. Los resultados mostraron una significativamente menor proliferación celular ($p=0.05$) en todas las concentraciones comparado con el grupo control. En la primera dilución (1mg/mL) el valor de absorbancia fue de 0.12 nm y el de la última dilución (0.007mg/mL) obtuvo también 0.12 nm. Las otras diluciones mostraron valores de absorbancia entre 0.09 y 0.11 nm. En contraste el valor de absorbancia del grupo control fue de 0.36 nm.

Tabla 5.
Actividad biológica de Doxorrubicina HCl sobre HT-29

Diluciones [mg/mL]	Doxorrubicina HCl * (nm)	Control (nm)
1.00	0.12	0.36
0.50	0.09	
0.25	0.09	
0.125	0.09	
0.0625	0.11	
0.03125	0.13	
0.015	0.11	
0.007	0.12	

* Diferencia significativa contra el grupo control

La Fig. 15 muestra la actividad biológica de LFE de las cuatro cepas probióticas frente a la línea celular HT-29, asimismo el grupo control positivo y negativo para la proliferación celular. Se observa que en las diluciones de 430mg/mL a 13mg/mL de *L. acidophilus*, *B. longum* y *L. casei* tuvieron una proliferación menor al grupo control negativo (doxorrubicina HCl); *L. plantarum* sólo de la dilución 430 mg/mL a la 26mg/mL.

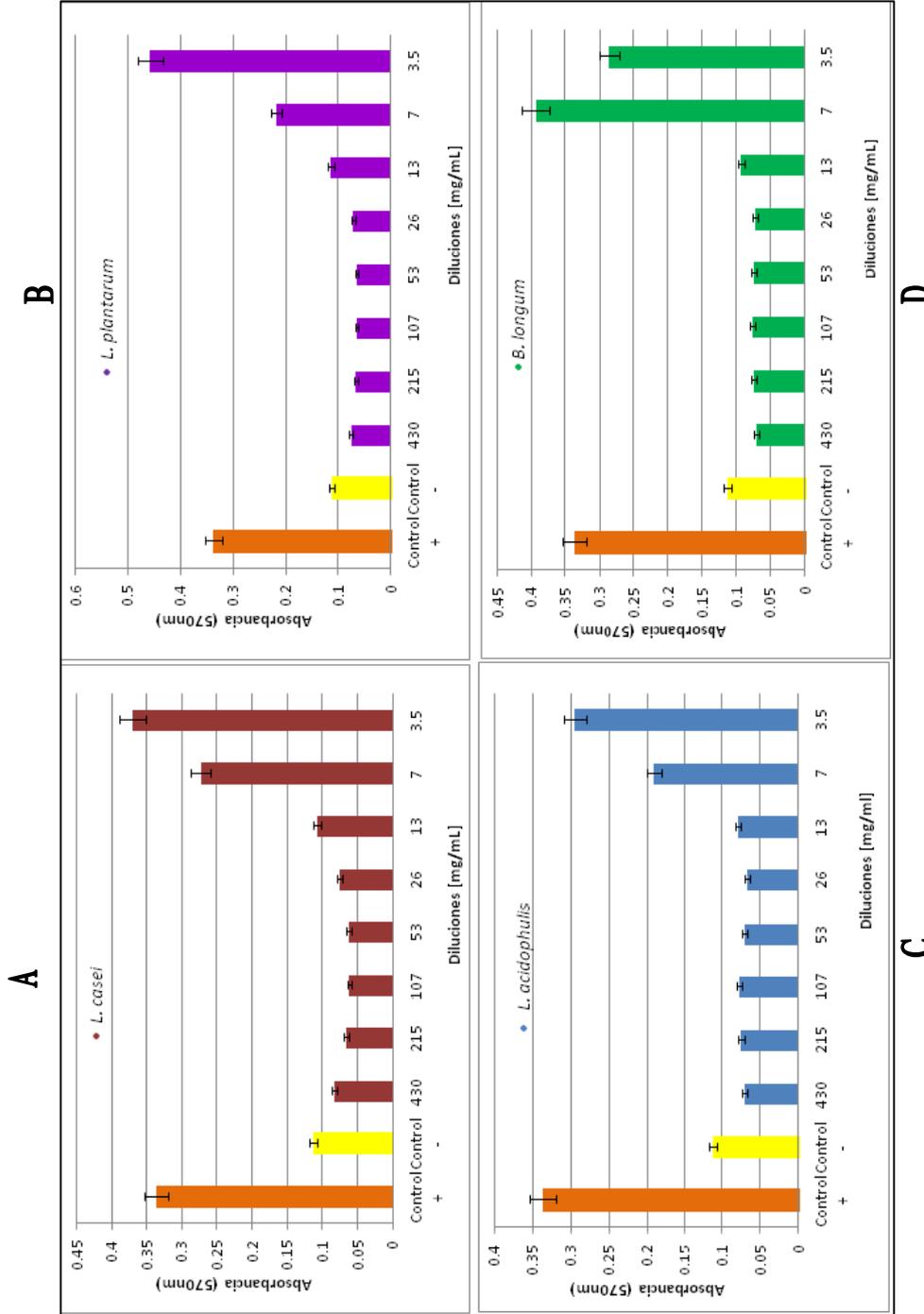


Fig. 15. Actividad biológica de LFE frente a HT-29. Lecturas de absorbancia a 570 nm de LFE frente a la línea celular HT-29, y de grupo control positivo de proliferación celular (naranja) y grupo control negativo (amarillo). A) Lecturas de LFE de *L. casei*. B) Lecturas de LFE de *L. plantarum*. C) Lecturas de LFE de *L. acidophilus*. D)

En la Fig. 16 se muestran las microplacas con la línea celular HT-29 después del método del MTT. En la figura A se observa el grupo control positivo para proliferación celular, la coloración oscura muestra que las células tienen metabolismo, asimismo se observa que en las últimas concentraciones para algunos FE de las cepas probióticas el efecto fue menor y se observa una coloración tenue; donde no hay color se describe como células no viables. En la figura B, la última columna es el grupo control negativo para proliferación (doxorubicina HCL) en el cual no hay coloración oscura.

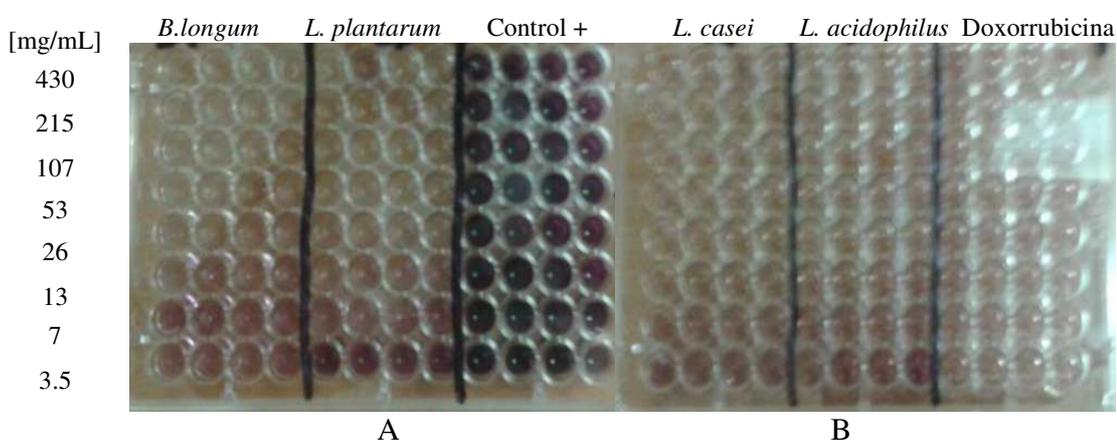


Fig. 16. Imágenes del bioensayo de los LFE y grupo control positivo y negativo contra HT-29. Fotografías tomadas al final de cada bioensayo; puede observarse la coloración oscura de viabilidad en el grupo control + y en las últimas dos concentraciones de los LFE.

Para *L. acidophilus* las concentraciones de 430 mg/mL a 7mg/mL son estadísticamente iguales y la que obtuvo diferencia significativa es 3.5mg/mL. Para *B. longum*, *L. plantarum* y *L. casei* las concentraciones de 430mg/mL a 13 mg/mL son semejantes y las de 7mg/mL y 3.5mg/mL tienen diferencia significativa entre ellas mismas y con las demás diluciones.

6.4.1 Dosis letal media (DL₅₀)

En la Tabla 6 se describe la DL₅₀ de los FE de las cepas probióticas y de Doxorubicina HCl. En la DL₅₀, *L. acidophilus* fue el LFE que presentó la menor cantidad (0.294 mg/mL) para inhibir el crecimiento de la línea celular HT-29, siguiendo *B. longum* (1.206 mg/mL), *L. plantarum* (2.973 mg/mL) y *L. casei* (5.132 mg/mL) fue quien requiere de mayor cantidad. En el caso de la doxorubicina HCl se requieren cantidades muy bajas para alcanzar la DL₅₀ (<0.0001mg/mL) (Anexo II).

Tabla 6.
DL₅₀ de los LFE frente a la línea celular HT-29

Tratamientos	DL ₅₀
<i>Lactobacillus casei</i>	5.132
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.973
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.294
<i>Bifidobacterium longum</i>	1.206
Doxorrubicina HCl	<0.0001

6.5 Prueba de citotoxicidad

Se realizó la prueba de citotoxicidad de los LFE de las cepas probióticas utilizando leucocitos; asimismo, también se hizo la prueba con los LFE + leucocitos + concavalina A (ConA); ésta como mitógeno. El grupo control fue medio de cultivo AIM-V + leucocitos; y, medio de cultivo AIM-V + leucocitos + ConA. En la Fig. 17 se muestra los resultados. Para *L. casei* las concentraciones de 215 mg/mL y 13mg/mL a 3.5mg/mL tuvieron mayor proliferación que *L. casei* + ConA pero ninguna dilución fue mayor al grupo control. *L. plantarum* en todas sus

concentraciones fue mayor la proliferación que *L. plantarum* + ConA, y en las diluciones de 215mg/mL, 107mg/mL y 7mg/mL fue mayor la proliferación que el grupo control. En las concentraciones de 13mg/mL a 3.5mg/mL los LFE de *L. acidophilus* tuvieron mayor proliferación que *L. acidophilus* + ConA y en las de 13mg/mL y 7mg/mL los resultados fueron mayores que el grupo control. En el caso de *B. longum* siempre fue mayor la proliferación que *B. longum* + ConA, pero ninguna fue mayor que el grupo control, en las concentraciones de 26mg/mL y 53mg/mL hubo menor proliferación.

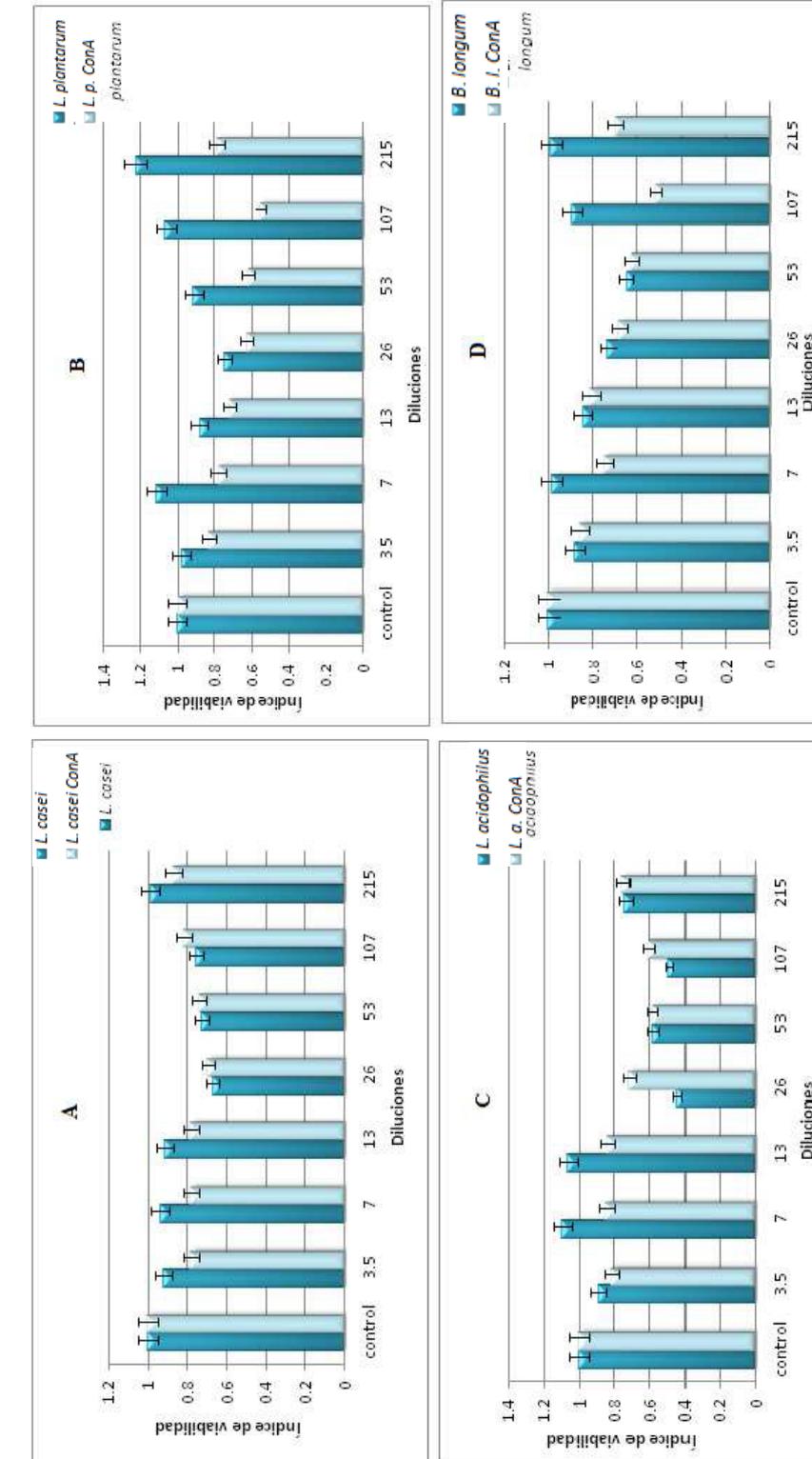


Fig. 17. Efecto de LFE de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* sobre la proliferación *in vitro* de células mononucleares de la de sangre periférica humana. Se muestran los tratamientos de los LFE de las cepas probióticas (oscuro) y LFE + Con A (claro). El grupo control fue sólo medio de cultivo y leucocitos. A) LFE de *L. casei* + ConA. B) LFE de *L. plantarum* y *L. plantarum* + ConA. C) LFE de *L. acidophilus* y *L. acidophilus* + ConA. D) LFE de *B. longum* y *B. longum* + ConA.

7. DISCUSIÓN

En el recuento bacteriano en placa, Fig. 13, *L. acidophilus* fue la cepa que mostró un mayor número de UFCs (652.66×10^9) seguido por *L. plantarum* (89.33×10^9), *B. longum* (59×10^9) y *L. casei* con el menor número (35.33×10^9); en la cinética de crecimiento *L. acidophilus* fue la cepa que en menor tiempo llegó a su fase estacionaria, el resultado para esta cepa podría relacionarse puesto que rápido tuvieron crecimiento exponencial y en el recuento en placa recuperaron su viabilidad mayor a las otras cepas probióticas.

El aspecto de los LFE de las cepas probióticas, además del rango de pH a nivel entre 4 y 5 y color entre amarillo, rojo, café y marrón, presentaban olor fuerte y durante varios minutos a temperatura ambiente se convertían a líquido aceitoso y su color cambiaba a más oscuro, véase tabla 3. Con estas características se sugiere que la composición de los LFE es mayor en ácidos grasos insaturados.

En la actividad biológica de los LFE, *L. acidophilus* tuvo diferencia significativa ($p=0.05$) con las cepas *B. longum*, *L. plantarum* y *L. casei*, tabla 4. En *L. acidophilus* las diluciones de 430 mg/mL a 13mg/mL fueron estadísticamente iguales y sólo la de 3.5mg/mL tuvo diferencia significativa. En el caso de *B. longum*, *L. plantarum* y *L. casei* las concentraciones de 430mg/mL a 13 mg/mL son semejantes y las de 7mg/mL y 3.5mg/mL tienen diferencia significativa entre ellas mismas y contra las demás diluciones. En *B. longum* la dilución de 7mg/mL no tuvo inhibición de la línea celular HT-29 y en la de 3.5mg/mL si se presenta inhibición, semejante a *L. acidophilus*, Fig. 15. *L. plantarum* y *L. casei* no obtuvieron inhibición en la dilución de 3.5mg/mL.

Asimismo se observa que en las diluciones de 430mg/mL a 13mg/mL de *L. acidophilus*, *B. longum* y *L. casei* tuvieron una proliferación menor al grupo

control negativo (doxorubicina HCl), excepto *L.plantarum* en la dilución de 13mg/mL, tablas 4 y 5.

En las DL₅₀ los LFE de *L. acidophilus* remarcan que se requiere menor cantidad para inhibir el crecimiento de la línea celular HT-29 (0.294 mg/mL), le siguen los LFE de *B. longum* (1.206 mg/mL), *L. plantarum* (2.973 mg/mL) y *L. casei* (5.132 mg/mL). La doxorubicina HCl requiere menor cantidad (<0.0001 mg/mL), tabla 6. Estos resultados respaldan los datos que se obtuvieron en la actividad biológica puesto que los LFE de *L. acidophilus* tienen mayor inhibición de la línea celular HT-29 aún con menor concentración.

Baricault *et al.* (1995) estudiaron el efecto de las leches fermentadas sobre el crecimiento celular del cáncer de colon y encontraron que el 10-50 % de las células HT-29 mostró una disminución en el crecimiento. Análisis posteriores revelaron que las actividades específicas del marcador específico para la diferenciación de células HT-29 tales como los péptidos dipeptidil se incrementaron. Los autores sugirieron que las células tumorales entraron en un proceso de diferenciación que conduce a crecimientos inferiores.

Lidbeck *et al.* (1991) demostraron una baja concentración de ácidos biliares secundarios en heces por la administración de leches fermentadas suplementadas con *L. acidophilus*. Asimismo en 1992 hicieron un importante estudio mostró que la mutagenicidad fecal se redujo por $\approx 28\%$ después de que el consumo de tanto carne frita y leche fermentada de *L. acidophilus*, en oposición a la leche fermentada con *Lactococcus* en los seres humanos.

Surono y Hosono (1996) y Nadathur *et al.* (1995) describen que la etapa de crecimiento de las bacterias también parece jugar un papel importante en antimutagenicidad. En la fase de crecimiento lineal, un profundo aumento en la actividad anti-mutagénica se produce, alcanzando un nivel máximo de actividad bacteriana que luego disminuye en la fase de crecimiento estacionario. Además

del número y la fase de crecimiento de las bacterias, es evidente que otros factores influyen en la anti-mutagenicidad.

Fotiadis *et al.* (2008) y Biasco *et al.* (1991) demostraron que el crecimiento de bacterias que liberan enzimas carcinogénicas, se inhibe por bajo pH y probióticos (*L. acidophilus* y *B. bifidum*), reportaron pH bajo en heces fecales con baja proliferación de colonias en criptas así como la reducción de la formación de los ácidos biliares secundarios.

Kulkarni y Reddy (1994), con una alimentación para ratas con *B. longum* reportaron una inhibición en formación de cripta aberrante (FCA) en 50% de los animales tratados. Challa *et al.* (1997) observaron una reducción del 23% en total colonización de FCA y 28% en total de cripta aberrante (AC) en ratas con una dieta suplementada con 0.5% de *B. longum* (1×10^8 células viables/g de alimento).

Singh *et al.* (1997) evaluaron el efecto de *B. longum* en la carcinogénesis de colon utilizando ratas macho destetadas F344. Los resultados de su estudio de 40 semanas demostraron que la administración dietética de cultivos liofilizados de *B. longum* resultó en una supresión de la incidencia de tumores de colon y el número de tumores y también redujo el volumen del tumor.

En su revisión sobre la prevención de cáncer de colon por probióticos, Brady *et al.* (2000) recogen un total de 24 observaciones sobre probióticos y tumores de colon, que describen la reducción por derivados lácteos fermentados por bacterias del ácido láctico, probando una relación inversa entre el consumo de probióticos y aparición de AC o el desarrollo de tumores en el colon.

Rowland (2008) encontró una baja incidencia de lesiones precancerosas (FCA) en el colon con la administración de probióticos a ratas.

Reddy *et al.* (1997) reportaron que un mayor crecimiento de bifidobacterias en el colon, lo cual puede resultar en la inhibición del desarrollo de FCA y multiplicidad de las criptas, lo cual fue atribuido a la reducción de pH por colonias de microorganismos que fueron responsables de inhibir el crecimiento de *E. coli* y *Clostridium*.

Al igual que los resultados de los trabajos antes descritos, nuestros resultados demostraron que las cepas de *L. acidophilus* y *B. longum* en los experimentos de los LFE fueron las que tuvieron mayor inhibición de la línea celular HT-29, y se requiere menor cantidad (0.294 mg/mL y 1.206 mg/mL respectivamente) en comparación con las cepas de *L. casei* (5.132mg/mL) y *L. plantarum* (2.973mg/mL). De hecho, *L. acidophilus* tuvo un efecto de inhibición de la línea celular HT-29 significativamente mayor ($p=0.05$) comparado con *B. longum*.

Los resultados obtenidos fueron similares a los de Baricault *et al.* (1995) puesto que hubo una inhibición de crecimiento de la línea celular HT-29, aunque con mayor porcentaje, a partir de 60% con los LFE de las cuatro cepas de probióticos utilizadas. Asimismo se respalda que los LFE de *L. acidophilus* y *B. longum* obtuvieron mejores resultados en comparación con Lidbeck *et al.* (1991), Singh *et al.* (1997), Kulkarni y Reddy (1994); Fotiadis *et al.* (2008) y Biasco *et al.* (1991).

En la prueba de citotoxicidad de los FE de *L. acidophilus* las concentraciones de 13mg/mL a 3.5mg/mL tuvieron mayor proliferación que el tratamiento de LFE+ConA y en las de 13mg/mL y 7mg/mL los resultados fueron mayores que el grupo control. En *L. casei* las concentraciones de 215 mg/mL y 13mg/mL a 3.5mg/mL hubo mayor proliferación que LFE+ConA pero ninguna mayor al grupo control. *L. plantarum* en todas sus concentraciones fue mayor la proliferación que LFE+ConA y en las diluciones de 215mg/mL, 107mg/mL y 7mg/mL fue mayor la proliferación que el grupo control. En el caso de *B. longum* siempre fue mayor la proliferación que LFE+ConA, pero ninguna fue mayor que

el grupo control, en las concentraciones de 26mg/mL y 53mg/mL hubo menor proliferación, Fig. 17.

Mateos (2002) ha relacionado el consumo de ciertos alimentos prebióticos, que contienen bifidobacterias y otras cepas de bacterias benéficas son estimuladoras de la síntesis de IgA.

Bujalance *et al.* (2007) en un estudio donde empleó *Lactobacillus plantarum* como inmunomodulador; ya que este estimuló significativamente a los esplenocitos en respuesta a la concavalina A y al mitógeno de las células T. Pirkka *et al.* (1999) observaron que *L. acidophilus* estimularon la proliferación basal *ex vivo* de linfocitos esplénicos de ratón. Matsuzaki *et al.* (2007) sugieren que algunas bacterias probióticas tienen potencial para aumentar o modificar la función inmune del huésped a través de la regulación de las células inmunes del huésped.

Estudios sobre las propiedades desmutagénicas de probióticos sugirieron que las sustancias desmutagénicas pueden residir en la envoltura celular de la pared celular bacteriana. Sekine *et al.* (1995) encontró en una preparación de la pared celular de *B. infantis*, tiene inhibición en la actividad del tumor en las células peritoneales de ratón de manera *in vitro*, mientras que Okawa *et al.* (1993) encontró en una preparación de la pared celular de *L. casei* (atenuada por calor) (LC9018) induce inmunidad contra la inducción de tumores en un estudio aleatorizado, controlado y comparativo con 223 pacientes con cáncer de cuello uterino en estadio III. Se encontró que los efectos antitumorales que se debe a la activación de macrófagos por LC9018.

Matsuzaki (1998) demostró que *L. casei* Shirota tiene efectos anti-tumorales y anti-metástasis de células tumorales transplantables, para suprimir la carcinogénesis inducida químicamente en los roedores y para inducir la producción de varias citoquinas, como el interferón- γ , IL-1 β y TNF- α que resultó

en la inhibición del crecimiento del tumor y el aumento de la supervivencia de los ratones portadores de tumores. Resultados similares han sido reportados por Lee *et al.* (2004) para las cepas de *L. acidophilus* SNUL, *L. casei* YIT9029 y *B. longum* HY8001. Sun *et al.* (2005) demostraron de manera *in vivo* que el peptidoglicano de una especie de *Lactobacillus* fue capaz de reducir el crecimiento de células de cáncer de colon CT26 en ratones BALB/c a través de un aumento en el nivel de la apoptosis. Curiosamente, el peptidoglicano no tuvo ningún efecto sobre la apoptosis de células tumorales *in vitro*, lo que implica que de forma *in vivo* el efecto anti-tumorigénicos pudo haber sido mediado por la respuesta inmune. Además de eso, los estudios recientes de Ghoneum *et al.* (2005) han demostrado que los probióticos pueden ser eficaces contra células Caco-2 de adenocarcinoma de colon; y Ghoneum y Gollapudi (2004) también lo demostraron contra una línea celular de cáncer de mama, lo que sugiere que las intervenciones terapéuticas probióticos puede no necesariamente se limita a los cánceres que afectan el tracto gastrointestinal sistema.

Los resultados que se obtuvieron en nuestro experimento con leucocitos, fue que los LFE de las cuatro cepas probióticas estimularon su proliferación, todas fueron mayor en comparación con el testigo de LFE+ConA ($p=0.05$), Fig. 17. Esto fue similar a lo reportado por Bujalance *et al.* (2007) y Pirkka *et al.* (1999) al estimular células del sistema inmune.

Fotiadis *et al.* (2008) y Wollowski *et al.* (2001) han escrito que el butirato inhibe la proliferación celular e incrementa la apoptosis de células transformadas pero produce efectos en contra de células normales. *Butyrivibrio fibrisolvens* MDT-1 produce altas cantidades de butirato. En la administración de MDT-1 a ratones con cáncer colorectal se ha encontrado que reduce ACF de manera significativa y disminuye la actividad de β -glucuronidasa y promueve la respuesta inmune, incrementa de las células natural killer (NK).

Clarke *et al.* (2011) examinaron el impacto de la creciente concentración de butirato intestinal con dieta de almidón butilado sobre el epitelio colónico de ratas tratadas con el azoximetano carcinógeno genotóxico (AOM). El aumento de la apoptosis fue marcada y proponen que la función pro-apoptótica de butirato juega un papel importante la reducción de la formación de tumor en ratas tratadas con AOM y que estos datos apoyan un papel protector potencial de butirato en el CRC.

Zhang *et al.* (2010) investigaron el mecanismo de la citotoxicidad de butirato en las células de cáncer de colon humano RKO. Sus resultados mostraron que el butirato indujo un fuerte efecto inhibitor del crecimiento contra las células RKO e indujo también la apoptosis en células RKO.

Roy *et al.* (2009) evaluaron el efecto de butirato y también en combinación con carnitine en células de cáncer de manera *in vitro*, examinaron proliferación y apoptosis, y encontraron que en combinación se inhibe la proliferación y se induce la apoptosis de la línea celular Caco-2.

Fung *et al.* (2011) identificaron proteínas implicadas en la apoptosis inducida por el butirato en las células HCT116. Demostraron que el butirato probablemente induce una respuesta de estrés celular en las células HCT116 que se caracterizan por la activación de p38 MAPK y una respuesta de estrés en retículo endoplasmático (ER). También reportaron, los procesos celulares adicionales alterados por butirato, como la biosíntesis del grupo hemo y la expresión desregulada de proteínas de la lámina nuclear, que pueden estar implicados en la respuesta apoptótica observada en estas líneas celulares.

Hay trabajos donde se muestran los efectos de SCFAs sobre líneas células de cáncer de colon, el butirato es el más estudiado. Los LFE de las cepas probióticas muy probablemente contienen algunos de estos SCFAs y pueden ser los responsables de la inhibición de proliferación de la línea celular HT-29 utilizada.

Asimismo, estos resultados proveen datos para realizar en un futuro análisis de ácidos grasos de los LFE, proteínas y realizar experimentos con diferentes azúcares para elucidar que compuestos específicos impactan en la inhibición del crecimiento; así como realizar también experimentos *in vivo*.

8. CONCLUSIONES

- Los liofilizados de los factores extracelulares de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* contienen compuestos de naturaleza lipídica, y muy probablemente son los responsables de la actividad biológica contra la línea celular HT-29 de cáncer de colon humano.
- Los LFE de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* inhiben el crecimiento de la línea celular HT-29.
- Los LFE de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* no tienen efecto citotóxico sobre linfocitos, e induce la proliferación de éstos.
- Los LFE de *L. acidophilus* tuvieron diferencia significativa con las otras cepas probióticas; mostraron mayor inhibición de la línea celular HT-29 de cáncer de colon humano y con menor cantidad.
- Los LFE de *L. acidophilus* y *B. longum* tuvieron mejores resultados que *L. casei* y *L. plantarum*.
- La concentración mínima inhibitoria media de los LFE de *L. casei* fue de 5.132 mg/mL, *L. plantarum* 2.973 mg/mL, *L. acidophilus* 0.294 mg/mL y *B. longum* 1.206 mg/mL.

9. PERSPECTIVAS

- Para ampliar el resultado de la interferencia microbiana de los LFE de las cepas probióticas un experimento *in vivo* confirmaría o pondría a discusión los resultados obtenidos en experimento *in vitro*.
- Por los resultados obtenidos en este trabajo se podrían realizar sinergias de cepas probióticas para observar el comportamiento que se generaría frente a líneas celulares de cáncer colorrectal.
- La composición de los LFE no está conocida completamente, por el aspecto está formado por ácidos grasos insaturados, con análisis de cromatografía de gases para obtener un perfil de ácidos grasos.
- Con el uso de microscopía de fuerza atómica (AFM) se pueden observar y obtener información de líneas celulares de cáncer después de la exposición de los LFE y demostrar que resultados hay con esta interacción microbiana.

10. LITERATURA CITADA

Artículos en Revistas

- Armstrong B. and R. Doll. 1975. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *International Journal of Cancer*; **15**:617-631.
- Arunachalam K. D. 1999. Role of *Bifidobacteria* in nutrition, medicine and technology. *Nutrition Research*; **19**: 1559-1597.
- Aso Y., H. Akaza, T. Kotake, T. Tsukamoto, K. Imai and S. Natio. 1995. Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. The BLP Study Group *European Urology*; **27**:104-109.
- Baricault L., G. Denariáz, J. J. Hourí, C. Bouley, C. Sapin and G. Trugnan. 1995. Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis*; **16**: 245-252.
- Barrón-González M.P., G. C. Serrano Vázquez, L. Villareal-Treviño, J. A. Verduzco Martínez, M. R. Morales Vallarta y B. D. Mata Cárdenas. 2008. Inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* por acción de probióticos. *Ciencias UANL*; **11**:235-290.
- Biasco G., G. M. Paganelli, G. Brandi, S. Brillanti, F. Lami, C. Callegari and G. Gizzi. 1991. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on rectal cell kinetics. *Italian Journal of Gastroenterology*; **23**: 142.

- Biavati B., N. Vascovo, S. Torreani and V. Bottazzi. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, psicology and applications. *Annual Microbiology*; **50**:117-131.
- Brady L. J., D. D. Gallaher and F. F. Busta. 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *Journal of Nutrition*; **130**:410-414.
- Bruce W. R. 1987. Recent hypotheses for the origin of colon cancer. *Cancer Research*; **47**: 4237-4242.
- Burns A. J. and I. R. Rowland. 2000. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*; **1**: 1324.
- Casas I. and W. J. Dobrogosz. 2000. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in human and animals. *Microbial Ecology in Health and Disease*; **12**:247-285.
- Challa A., D. R. Rao, C. B. Chawan and L. Shackelford. 1997. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*; **18**: 517-521.
- Chung H. S., Y. B. Kim, S. L. Chun and G. E. Ji. 1999. Screening and selection of acid and bile resistan bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*; **47**:25-32.
- Clarke J. M., G. P. Young, D. L. Topping , A. R. Bird, L. Cobiac, B. L. Scherer, J. G. Winkler and T. J. Lockett. 2011. Butyrate delivered by butyrylated starch increases distal colonic epithelial apoptosis in carcinogen-treated rats. *Oxford Journals Life Sciences & Medicine Carcinogenesis*; **33**: 197-202.

- De La Cochetière M. F. T., P. Durand, A. Lepage, J. P. Burreille and J. Dore. 2005. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *Journal of Clinical Microbiology*; **43**:5588-5592.
- Dunne C., L. Murphy, S. Flynn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morrissey, G. Thornton, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E.M.M. Quigley, G.C. O'Sullivan, F. Shanahan and J.K. Collins. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antoine van Leewenhoek*; **76**:279-292.
- El-Nezami H., H. Mykkänen, P. Kankaanpää, S. Salminen and J. Ahokas. 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Probionibacterium* strains to remove aflatoxin B₁ from chicken duodenum. *Journal of Food Protection*; **63**:549-552.
- FAO/OMS Consulta de Expertos sobre Evaluación de las Propiedades Saludables Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico, 1-4 de octubre de 2001.
- Forman M. R., S. D. Hursting, A. Umar and J. C. Barret. 2004. Nutrition and cancer prevention. *Annual Revision of Nutrition*; **24**:223-54.
- Fotiadis C. I., C. N. Stoidis, B. G. Spyropoulos and E. D. Zografos. 2008. Role of probiotics, prebiotics and symbiotic in chemoprevention for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*; **14(42)**: 6453-6457.
- Freitas M. and C. Cayuela. 2000. Microbial modulation of host intestinal glycosylation patterns. *Microbial Ecology in Health and Disease*; **12**: 165-178.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*; **66**:365-378.

- Fung K. Y. C., G. V. Brierley, S. Henderson, P. Hoffmann, S. R. McColl, T. Lockett, R. Head and L. Cosgrove. 2011. Butyrate-Induced Apoptosis in HCT116 Colorectal Cancer Cells Includes Induction of a Cell Stress Response. *Journal Proteome Research*; **10**(4): 1860–1869.
- Ghoneum M., J. Hamilton, J. Brown and S. Gollapudi. 2005. Human squamous cell carcinoma of the tongue and colon undergoes apoptosis upon phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, in vitro. *Anticancer Research*; **25**:981–989.
- Ghoneum M. and S. Gollapudi. 2004. Induction of apoptosis in breast cancer cells by *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, in vitro. *Anticancer Research*; **24**:1455–1463.
- Gibson G. R. and M. B. Roberfroi. 1995. Dietary modulation of the colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*; **125**:1401-1412.
- Gomes M. P. A. and F. X. Malcata. 1999. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*; **10**: 139-157.
- Gomez A. and F. Malacata. 1999. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. *Trend Food Science Technology*; **10**:139-157.
- Gupta V. and R. Garg. 2009. Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*; **27**: 202-209.

- Hamilton-Miller J. M. T., G. R. Gibson and W. Bruck. 2003. Some insight into the derivation and early uses of the word “probiotic”. *British Journal of Nutrition*; **90**: 845.
- Hertzler S. R. and S. M. Clancy. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*; **103**: 582-587.
- Holzapel W. H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger and J. H. J. Huis in't Veld. 1998. Overview of gut flora & probiotics. *International Journal of Food Microbiology*; **41**: 85-101.
- Hosada M., H. Hashimoto, D. He, H. Morita and A. Hosono. 1996. Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on faecal mutagenicity and microflora in human intestine. *Journal of Dairy Science*; **79**:745-749.
- Jemal A, T. Murray, E. Ward, A. Samuels, R. C. Tiwari and A. Chafoor. 2005. Cancer Statistics. *CA: a Cancer Journal Clinical*; **55**:10-30.
- Kailasapathy K. and J. Chin. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology and Cell Biology*; **78**: 80-88.
- Kleessen B., E. Bezirtzoglou and J. Mättö. 2000. Cultures-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease*; **12**:53-63.
- Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte and G. Reuter. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*; **41**:103-125.

- Kó•ová J., A. Španová and B. Rittich. 2006. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and species-specific PCR for identification of *Bifidobacterium* species. *Systematic and Applied Microbiology*; **29**:36-44.
- Kolars J. C., M. D. Levitt, M. Aouji and D. A. Savaiano. 1984. Yogurt: an autodigesting source of lactose. *The New England Journal of Medicine*; **310**:1-3.
- Kulkarni N. and B. S. Reddy. 1994. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane induced aberrant crypt foci formation and faecal bacterial β -glucuronidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; **207**: 278283.
- Lee J. W., J. G. Shin, E. H. Kim, H. E. Kang, I. B. Yim, J. Y. Kim, H. G. Joo and H. J. Woo. 2004. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *Journal of Veterinary Science*; **5**:41–48.
- Ley R. E., D. A. Peterson and J. L. Gordon. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*; **124**:837-848.
- Lidbeck A., U. Geltner-Allinger, L. Oehage, B. Brismar, J. Gustafson, J. J. Rafter and C.E. Nord. 1991. Impact of *L. acidophilus* supplements on the faecal microflora and soluble faecal acids in colon cancer patients. *Microbial Ecology in Health and Disease*; **4**:81-88.
- Liévin-Le Moal V. and A. L. Servin. 2006. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*; **19**:315-337.
- Lilly, D. M and R. H. Stillwell. 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science*; **147**:747-748.

- Linder J. D., C. Canchaya, Z. Zhang, E. Neviani, G. F. Fitzgerald, D. V. Sinderen and M. Ventura. 2007. Exploring *Bifidobacterium* genomes: The molecular basis of stress response. *International Journal of Food Microbiology*; **120**:13-24.
- Liong M. T. 2008. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and *in vivo* evidence. *International Journal of Molecular Sciences*; **9**: 854-863.
- Lopez Brea M. and D. Domingo. 2007. Antibiotic therapy with probiotics. *Revista Española de Quimioterapia*; **20**:170-18.
- Lourens-Hattingh A. y C. B. Viljeon. 2001. Yoghurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*; **11**: 1-17.
- Macfarlane S., M. J. Hopkins y G. T. Macfarlane. 2000. Bacterial growth and metabolism on surfaces in the large intestine. *Microbial Ecology in Health and Disease*; **12**:64-72.
- Mackay A. D., M. B. Taylor, C. C. Kibbler and J. M. Hamilton-Miller. 1999. *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clinical Microbiology Infection*; **5**: 290-292.
- Martínez M. J. 2001. Agentes probióticos y patología intestinal. *Anales Españoles de Pediatría*; **54**: 15-16.
- Matthew A. 2012. A Gastroenterologist's Guide to Probiotics. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **10(9)**:960-968, DOI: 10.1016/j.cgh.2012.03.024)

- Matsumoto M. and Y. Benno. 2004. Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutation Research*; **568**:147-153.
- Matsuzaki T. 1998. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *International Journal of Food Microbiology*; **41**:133–140.
- Mennickent S. y K. Green. 2009. Los probióticos y su utilidad terapéutica. *Ciencia Ahora*; **24**:31-38.
- Oatley J. T., M. D. Rarick, G. E. Ji and J. E. Linz. 2000. Binding of aflatoxin B₁ to bifidobacteria *in vitro*. *Journal of Food Protection*; **63**:1133-1136.
- Ouwehand C. A., V. P. Kirjavainen, C. Shortt and S. Salminen. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*; **9**:42-52.
- Rasic J. L and J. A. Kurmann. 1983. Bifidobacteria and their Role. Microbiological, Nutritional-Physiological, Medical and Technological Aspects and Bibliography. *Experientia Supplied*; **39**: 1-295.
- Rastall R. A. 2004. Bacteria in the gut; friends and foes and how to alter the balance. *Journal Nutritional*; **134**:2022S-2026S.
- Rautio M., H. Jousimies-Somer and H. Kauma. 1999. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus strain GG*. *Clinical Infectious Diseases*; **28**:1159-1160
- Reddy B. S, R. Hamid and C.V. Rao. 1997. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis*; **18**: 1371-1374.

- Reid G., J. Jass, M. T. Selbusky y J. K. McCornick. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*; **16**:658-672
- Rowland I. 2008. Probiotics and cancer – from *in vitro* to human studies. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*; **3**:165-168.
- Roy M. J., S. Dionne, G. Marx, I. Qureshi, D. Sarma, E. Levy and E. G. Seidman. 2009. *In vitro* studies on the inhibition of colon cancer by butyrate and carnitine. *Nutrition*; **25**: 1193-1201.
- Sakata S., C. S. Ryu, M. Kitachara, M. sakamoto, H. Hayashi, M. Fukumaya and Y. Benno. 2006. Characterization of the genus *Bifidobacterium* by automated ribotyping and 16S rRNA gene sequences. *Microbiology and Immunology*; **50**:1-10.
- Salminen S., E. Isolauri and E. Salminen. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier; successful strains and future challenges. *Antoine van Leewenhoek*; **70**:347-358.
- Salminen S. 1996. Uniqueness of probióticos strains. *News Letter*; **5**:16-18.
- Saxelin M., H. Rautelin, S. Salminen and P. H. Mäkelä. 1996. The safety of commercial products with viable *Lactobacillus* strains. *Infectious Diseases in Clinical Practice*; **5**: 331-335.
- Seksik P., L. Rigottier-Gois, G. Gramet, M. Sutren, P. Pochart, P. Marteau, R. Jian and J. Dore. 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohns disease of the colon. *International Journal in Gastroenterology*; **52**: 237-242.

- Singh J., A. Rivenson, M. Tomita, S. Shimamura, N. Ishibashi and B. S. Reddy. 1997. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*; **18**: 833–841.
- Singh V., K. Singh, S. Amdekar, D. D. Singh, P. Tripathi, G. L. Sharma y H. Yadav. 2009. Innate and specific gut-associated immunity and microbial interference. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*; **55**: 6-12.
- Sreefumar O. and A. Hosono. 2000. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and faecal enzymes of rats and the *in vitro* inhibition of *Escherichia coli* coculture. *Journal Dairy Science*; **83**:931-939.
- Sun J., Y. H. Shi, G. W. Le and X. Y. Ma. 2005. Distinct immune response induced by peptidoglycan derived from *Lactobacillus* sp. *World Journal of Gastroenterology*; **11**:6330–6337.
- Tannock G. W., K. Munro, H. J. Harmsen, G. W. Welling, J. Smart and P. K. Gopal. 2000. Analysis of fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Applied and Environmental Microbiology*; **66**: 2578-2588.
- Tannock G. W. 1999. Analysis of the intestinal microflora: A resistance. *Antoine van Leeuwenhoek*; **76**:265-278.
- Tannock G. W. 2004. A special fondness for Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*; **70**:3189-3194.
- Valsiljevic T. y N. P. Shah. 2008. Probiotics from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*; **18**: 714-728.

Willett W. C. 2001. Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiology Biomarkers Preventive*; **10**:3-8.

Wong, J. M., R. de Souza, C. W. Kendall, A. Emam and D. J. Jenkins. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*; **40**:235-243.

Woodmansey E. J., M. E. McMurdo, G. T. Macfarlane and S. Macfarlane. 2004. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Applied Environmental Microbiology*; **70**: 6113-6122.

Zhang Y., L. Zhou, Y. Li, B. Yin, W. Chun, L. Yu, Y. Xin, H. Ying, S. Li, H. Zheng and Y. X. Li. 2010. Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells. *Chemico-Biological Interactions*; **18**: 174–181.

Libros

Bujalance M. C. M. 2006. Modificación de la respuesta biológica por microorganismos probióticos en modelos de animals inmunocompetentes e inmunocomprometidos. Editorial de la Universidad de Granada. pp. 52.

Calderon Villa Ariel. 2011. Actividad biológica del liofilizado de factores difusibles de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus casei rhamnosus* cultivadas en diferentes fuentes de carbono sobre *Giardia lamblia*. 2011. Tesis de Licenciatura, FCB/UANL.

Dotan I. y L. Mayer. 2003. Intestinal immunity, p.43-59. En G.A. Hecht (ed.), *Microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cell*. ASM Press, Washington.

- Figuerola I., L. Gómez-Ruiz, M. García y A. Cruz-Guerrero. 2006. El beneficio de los probióticos. *Industria Alimentaria*. 22-27.
- García Cobos Alejandra 2010. Actividad biológica de los liofilizados del medio condicionado con *Bifidobacterium longum* y con *Lactobacillus casei* sobre *Salmonella spp.* *Serratia marcescens* y *Enterobacter cloacae*. Tesis de Licenciatura, FCB/UANL-2011.
- García-Garibay M. 1996. Leches fermentadas como vehículos de probióticos.
- Geier M. S., R. N. Butler and G. S. Howarth. 2006. Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer? Hampl JS, DiSilvestro RA (ed.). *Perspectives in nutrition*. 6.^a edition.
- Hertzler S. 1996. Probiotics and prebiotics and human health. En: Wardlaw GM,
- Keseel J. and H. J. Klupsch. 1984. Method of producing kefir. German Federal
- Keshav S. 2004. Paneth cells in innate immunity and intestinal inflammation, p.171-196. En S.H.E. Kaufmann, R. Medzhitov S. Gordon (eds). *The innate immune response to infection*. ASM Press, Washington.
- Madigan M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2004. Brock. *Biología de los microorganismos*. Pearson Educación.
- Mateos J. A. Bacterias y salud. *Jornadas de Alimentos Funcionales*. 2002. Centre I nnovació. Fundació Bosch i Gimpera. Universidad. de Barcelona.
- Moreau M. C. and V. Gaboriau-Routhiau. 2000. Influence of resident intestinal microflora on the development and functions of the intestinal-associated lymphoid tissue, p.69-114. En R. Fuller y G. Perdígón (eds.), *Probiotics 3*:

immunomodulation by the gut microflora and probiotics. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Ontiveros L. H. 2011. Actividad biológica de factores difusibles de probióticos (FDP) sobre *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis* bajo condiciones axénicas *in vitro*. Tesis de Doctorado FCB UANL.

Prescott L. M., J. P. Harley y D. A. Klein. 2005. Microbiology (6th ed). McGraw-Hill, Boston.

Puertollano E., M. A. Puertollano, L. Cruz Chamorro, G. Alvarez de Cienfuegos y M. A de Pablo. 2005. Acción de los concentrados proteicos de *Lactobacillus plantarum* sobre una línea leucémica humana. Universidad de Jaén. Área de microbiología, 23071.

Ruiz-Bravo, A., M. Jiménez-Valera, M. M. López y A. Sampedro. 1992. Fundamentos de biología e inmunología tumoral. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Granada, Granada.

Salminen S., M. A. Deighton, Y. Benno and S. L. Gorbach. 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. En Lactic acid bacteria 2nd edition (Salminen S. Y von Wright, eds.) Marcel Dekker, Inc., New York. Pp. 211-253.

Saloff-Coste C. J. 1997. Beneficios de las leches fermentadas y de los probióticos sobre la salud, pp. 6-10.

Sidhu S., J. S. Deep, R. C. Sobti, V. L. Sharma and H. Thakur. 2010. Methylation pattern of MGMT gene in relation to age, smoking, drinking and dietary habits as epigenetic biomarker in prostate cancer patients. Genetic Engineering and Biotechnology Journal, 2010: GEBJ.

- Tannock G. W. 1995. Normal Microflora: An Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body. Chapman and Hall.
- Turner J. R. 2003. Functional morphology of the intestinal mucosa: from crypts to tips, p.1-22. En G.A. Hecht (ed.), Microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cell. ASM Press, Washington.
- Walker R. and M. Buckley. 2006. Probiotic microbes: the scientific bases. A report from the American Academy of Microbiology. ASM Press. Washington.
- Weisburger J. H. and E. L. Wynder. 1987. Etiology of colorectal cancer with emphasis on mechanism of action and prevention. In Important Advances in Oncology. Edited by De Vita VT(Jr.), Hellman S, Rosenberg SA. Philadelphia, PA: JB Lippincott, 197–220.
- Wollowski I, G. Rechkemmer and B. L. Pool-Zobel. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. American Journal. York. McGraw Hill; pp. 98-100.
- Zamora Herrera F.G., M. Morales Vallarta y M.P. Barrón González. 2007. Efecto del liofilizado del medio condicionado con el probiótico *Bifidobacterium sp.* Sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Material electrónico

CAM Therapies. Probiotics. Disponible en:
http://healthfinder.gov/search/?sort=date%253AD%253AL%253Ad1&output=xml&ie=UTF8&client=healthfinder&lr=lang_en&numgm=5&site=healthfinder&filter=0&q=probiotics

Euzéby, J.P. 2006. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponible en: <http://www.bacterio.net>

FAO. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>

NORMA Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5167303&fecha=16/11/2010.

Patel KP, Patel VJ, 2010. Probiotics, prebiotics and synbiotics. Disponible en: [<http://www.nhlmmcgym.com/indian-journal15.htm>]

www.yakult.com

Prebiotics, 2010. [http://170.107.206.70/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/pre_0326.shtml]

OMS, 2008. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

<http://www.cancer.org/espanol/cancer/colonyrecto/guiadetallada/cancer-colorrectal-treating-chemotherapy>

INEGI, 2011, www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/.../estadisticas/.../cancer0.do...

Cordero y Aristizábal, 2002: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/30098>

Parra y Aristizábal:
www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data.../EVALUACION%20.pdf

The absolute importance of probiotics, 2009.
[http://www.vitamintrader.com/articles/2006_12_probiotics.html]

<http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/tercero/integradotercero/ApFisiopSist/gastro/Fp tDiarrea.html>

<http://www.norel.es/pdf/3%20Use%20of%20additives%20as%20a%20preventive%20to ol%20agains%20infection%20diseases.pdf>

ANEXO I

Preparación de soluciones y medios de cultivo.

SOLUCIÓN	DESCRIPCIÓN
Ácido clorhídrico(0.1N)	Se afora hasta 50 mL con agua bidestilada desionizada 0.41 mL de HCl concentrado (12N).
Citrato férrico de amonio (1%)	Se disolvió 0.1g de citrato férrico de amonio en (CFA) 10 mL de agua bidestilada desionizada; y se mantuvo en refrigeración en un frasco ámbar a 4°C, hasta su empleo. Se esterilizó por medio de filtración.
Hidróxido de sodio (10N)	Se disolvieron 40g de hidróxido de sodio (NaOH) en 100mL de agua bidestilada desionizada.
Solución salina (0.85%)	Se disolvieron 0.85g de cloruro de sodio (NaCl) en 100mL de agua bidestilada desionizada y se ajustó a pH7.0. Se esterilizó en autoclave por 15 min a 15Lb de presión a 121°C. Se mantiene en refrigeración a 4°C, hasta su empleo.
Medio AIM-V	Medio para el cultivo de la línea celular HT-29, se adquirió en Aceso-Lab. GIBCO®.
Suero fetal bovino inactivado	Se adquirió en Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA. GIBCO®. Se inactivó colocándolo en un baño de calentamiento a 56°C durante 30 minutos. Se mantuvo en refrigeración a 4°C.
Ficoll-Paque	Se adquirió en Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA.
Concavalina A	Se adquirió em Biomedias INC. Se disolvieron 2.5mg de concavalina-A en 1mL de agua destilada. Se tomaron 96µL y se disolvieron en 10mL de AIM-V y posteriormente se filtró.
Tripsina-EDTA	Se adquirió en Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA.
DMSO	Se adquirió en Probiotek.
Azul de trypan	Se adquirió en Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA. Se preparó pesando 0.2g y se aforó a 100mL con agua destilada. Se esterilizó por filtración y se almacenó en refrigeración a 4°C .
Doxorrubicina HCl	Se adquirió de Zurich Pharma, en solución de 10 mg. Se le agregaron 10 mL de agua destilada y ésta fue la solución madre.
Bromuro de Tetrazolio (MTT)	El MTT se disolvió en PBS a una concentración de 5mg/mL a temperatura ambiente. La solución se esterilizó por filtración y se almacenó en refrigeración a 4°C.
MPT-agar	Se preparó con peptona de caseína, extracto de levadura, NaCl, glucosa, ácido ascórbico, L-cisteína, KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , citrato férrico de amonio y agar nutritivo.
MPT-caldo	Se preparó con peptona de caseína, extracto de levadura, NaCl, glucosa, ácido ascórbico, L-cisteína, KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ y citrato férrico de amonio.
CO ₂	Se adquirió en Praxair.

ANEXO II

Probit

L. casei

Probit Analysis

Data Information

		N of Cases
Valid		88
Rejected	Missing	2
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	8
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	8	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a Dosis	-.271	.162	-1.676	.094	-.589	.046
Intercept	.444	.634	.700	.484	-.190	1.078

a. PROBIT model: $PROBIT(p) = \text{Intercept} + BX$ (Covariates X are transformed using the base 2.718 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	3.332	86	1.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	27093.124	.	.	10.207	.	.
.020	9923.234	.	.	9.203	.	.
.030	5246.801	.	.	8.565	.	.
.040	3248.627	.	.	8.086	.	.
.050	2199.629	.	.	7.696	.	.
.060	1578.359	.	.	7.364	.	.
.070	1179.831	.	.	7.073	.	.
.080	909.194	.	.	6.813	.	.
.090	717.363	.	.	6.576	.	.
.100	576.770	.	.	6.357	.	.
.150	233.760	.	.	5.454	.	.
.200	114.035	.	.	4.737	.	.
.250	61.602	.	.	4.121	.	.
.300	35.435	.	.	3.568	.	.
.350	21.226	.	.	3.055	.	.
.400	13.053	.	.	2.569	.	.
.450	8.154	.	.	2.099	.	.
.500	5.132	.	.	1.636	.	.
.550	3.230	.	.	1.173	.	.
.600	2.018	.	.	.702	.	.
.650	1.241	.	.	.216	.	.
.700	.743	.	.	-.297	.	.
.750	.428	.	.	-.850	.	.
.800	.231	.	.	-1.465	.	.
.850	.113	.	.	-2.183	.	.
.900	.046	.	.	-3.086	.	.
.910	.037	.	.	-3.305	.	.
.920	.029	.	.	-3.542	.	.
.930	.022	.	.	-3.802	.	.
.940	.017	.	.	-4.093	.	.
.950	.012	.	.	-4.425	.	.
.960	.008	.	.	-4.815	.	.
.970	.005	.	.	-5.294	.	.
.980	.003	.	.	-5.932	.	.
.990	.001	.	.	-6.936	.	.

a. Logarithm base = 2.718.

L. plantarum

Probit Analysis

Data Information

		N of Cases
Valid		89
Rejected	Missing	2
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	7
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	7	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a Dosis	-.229	.163	-1.411	.158	-.548	.089
Intercept	.250	.635	.394	.694	-.385	.885

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 2.718 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	2.930	87	1.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	75749.400	.	.	11.235	.	.
.020	23071.059	.	.	10.046	.	.
.030	10851.364	.	.	9.292	.	.
.040	6152.566	.	.	8.725	.	.
.050	3877.984	.	.	8.263	.	.
.060	2618.131	.	.	7.870	.	.
.070	1855.221	.	.	7.526	.	.
.080	1362.858	.	.	7.217	.	.
.090	1029.516	.	.	6.937	.	.
.100	795.243	.	.	6.679	.	.
.150	273.047	.	.	5.610	.	.
.200	116.750	.	.	4.760	.	.
.250	56.325	.	.	4.031	.	.
.300	29.270	.	.	3.377	.	.
.350	15.959	.	.	2.770	.	.
.400	8.975	.	.	2.194	.	.
.450	5.143	.	.	1.638	.	.
.500	2.973	.	.	1.090	.	.
.550	1.719	.	.	.542	.	.
.600	.985	.	.	-.015	.	.
.650	.554	.	.	-.591	.	.
.700	.302	.	.	-1.197	.	.
.750	.157	.	.	-1.852	.	.
.800	.076	.	.	-2.581	.	.
.850	.032	.	.	-3.430	.	.
.900	.011	.	.	-4.499	.	.
.910	.009	.	.	-4.758	.	.
.920	.006	.	.	-5.038	.	.
.930	.005	.	.	-5.347	.	.
.940	.003	.	.	-5.691	.	.
.950	.002	.	.	-6.084	.	.
.960	.001	.	.	-6.545	.	.
.970	.001	.	.	-7.113	.	.
.980	.000	.	.	-7.867	.	.
.990	.000	.	.	-9.056	.	.

a. Logarithm base = 2.718.

L. acidophilus

Probit Analysis

Data Information

		N of Cases
Valid		91
Rejected	Missing	2
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	5
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	8	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a Dosis	-.140	.155	-.908	.364	-.444	.163
Intercept	-.172	.605	-.284	.776	-.777	.433

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 2.718 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	1.837	89	1.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	4600191.398	.	.	15.342	.	.
.020	660331.907	.	.	13.400	.	.
.030	192706.858	.	.	12.169	.	.
.040	76302.537	.	.	11.242	.	.
.050	35912.996	.	.	10.489	.	.
.060	18909.441	.	.	9.847	.	.
.070	10775.185	.	.	9.285	.	.
.080	6512.150	.	.	8.781	.	.
.090	4119.317	.	.	8.323	.	.
.100	2702.329	.	.	7.902	.	.
.150	471.747	.	.	6.156	.	.
.200	117.829	.	.	4.769	.	.
.250	35.842	.	.	3.579	.	.
.300	12.310	.	.	2.510	.	.
.350	4.572	.	.	1.520	.	.
.400	1.787	.	.	.580	.	.
.450	.720	.	.	-.329	.	.
.500	.294	.	.	-1.224	.	.
.550	.120	.	.	-2.119	.	.
.600	.048	.	.	-3.028	.	.
.650	.019	.	.	-3.968	.	.
.700	.007	.	.	-4.958	.	.
.750	.002	.	.	-6.027	.	.
.800	.001	.	.	-7.217	.	.
.850	.000	.	.	-8.604	.	.
.900	.000	.	.	-10.349	.	.
.910	.000	.	.	-10.771	.	.
.920	.000	.	.	-11.229	.	.
.930	.000	.	.	-11.732	.	.
.940	.000	.	.	-12.295	.	.
.950	.000	.	.	-12.936	.	.
.960	.000	.	.	-13.690	.	.
.970	.000	.	.	-14.616	.	.
.980	.000	.	.	-15.848	.	.
.990	.000	.	.	-17.789	.	.

a. Logarithm base = 2.718.

B. longum

Probit Analysis

Data Information

		N of Cases
Valid		90
Rejected	Missing	2
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	6
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	7	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a Dosis	-.182	.154	-1.177	.239	-.484	.121
Intercept	.034	.601	.056	.955	-.567	.635

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + BX$ (Covariates X are transformed using the base 2.718 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	2.462	88	1.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	442325.692	.	.	13.000	.	.
.020	98558.010	.	.	11.498	.	.
.030	38017.797	.	.	10.546	.	.
.040	18568.329	.	.	9.829	.	.
.050	10366.308	.	.	9.246	.	.
.060	6311.823	.	.	8.750	.	.
.070	4085.361	.	.	8.315	.	.
.080	2767.395	.	.	7.926	.	.
.090	1941.903	.	.	7.571	.	.
.100	1401.568	.	.	7.245	.	.
.150	363.327	.	.	5.895	.	.
.200	124.254	.	.	4.822	.	.
.250	49.492	.	.	3.902	.	.
.300	21.653	.	.	3.075	.	.
.350	10.066	.	.	2.309	.	.
.400	4.866	.	.	1.582	.	.
.450	2.409	.	.	.879	.	.
.500	1.206	.	.	.187	.	.
.550	.603	.	.	-.505	.	.
.600	.299	.	.	-1.208	.	.
.650	.144	.	.	-1.935	.	.
.700	.067	.	.	-2.701	.	.
.750	.029	.	.	-3.528	.	.
.800	.012	.	.	-4.449	.	.
.850	.004	.	.	-5.521	.	.
.900	.001	.	.	-6.872	.	.
.910	.001	.	.	-7.198	.	.
.920	.001	.	.	-7.552	.	.
.930	.000	.	.	-7.941	.	.
.940	.000	.	.	-8.376	.	.
.950	.000	.	.	-8.872	.	.
.960	.000	.	.	-9.455	.	.
.970	.000	.	.	-10.172	.	.
.980	.000	.	.	-11.125	.	.
.990	.000	.	.	-12.626	.	.

a. Logarithm base = 2.718.

Doxorrubicina HCl

Probit Analysis

Data Information

		N of Cases
Valid		16
Rejected	Missing	8
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	8	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a CD	-.022	.335	-.065	.948	-.678	.634
Intercept	-.566	.988	-.573	.567	-1.554	.422

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + BX$ (Covariates X are transformed using the base 2.718 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	.119	14	1.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for CD			95% Confidence Limits for log(CD) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	7.680E34	.	.	80.326	.	.
.020	3.048E29	.	.	67.890	.	.
.030	1.141E26	.	.	59.999	.	.
.040	3.014E23	.	.	54.063	.	.
.050	2.411E21	.	.	49.234	.	.
.060	3.957E19	.	.	45.124	.	.
.070	1.077E18	.	.	41.521	.	.
.080	4.277E16	.	.	38.295	.	.
.090	2.274E15	.	.	35.360	.	.
.100	1.526E14	.	.	32.659	.	.
.150	2.123E9	.	.	21.476	.	.
.200	293002.708	.	.	12.588	.	.
.250	142.994	.	.	4.963	.	.
.300	.152	.	.	-1.885	.	.
.350	.000	.	.	-8.230	.	.
.400	.000	.	.	-14.251	.	.
.450	.000	.	.	-20.077	.	.
.500	.000	.	.	-25.810	.	.
.550	.000	.	.	-31.543	.	.
.600	.000	.	.	-37.368	.	.
.650	.000	.	.	-43.390	.	.
.700	.000	.	.	-49.735	.	.
.750	.000	.	.	-56.582	.	.
.800	.000	.	.	-64.208	.	.
.850	.000	.	.	-73.096	.	.
.900	.000	.	.	-84.279	.	.
.910	.000	.	.	-86.980	.	.
.920	.000	.	.	-89.914	.	.
.930	.000	.	.	-93.141	.	.
.940	.000	.	.	-96.744	.	.
.950	.000	.	.	-100.854	.	.
.960	.000	.	.	-105.682	.	.
.970	.000	.	.	-111.618	.	.
.980	.000	.	.	-119.509	.	.
.990	.000	.	.	-131.946	.	.

a. Logarithm base = 2.718.