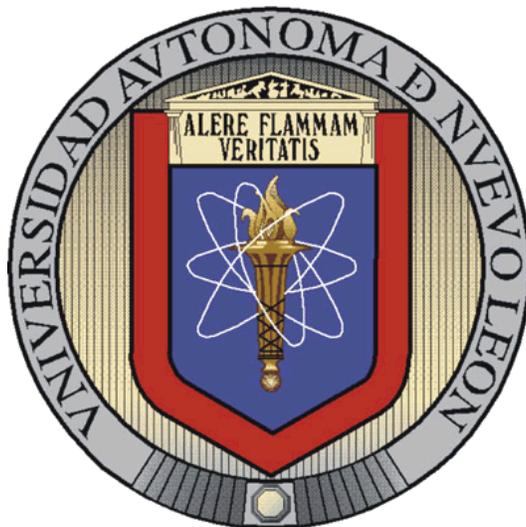


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**Obtención y caracterización de posbióticos de *Lactobacillus sp.* /
Bifidobacterium longum y su evaluación sobre carcinoma murino**

Por

L.B.G. CARLOS DANIEL GASTALDI ELIZONDO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN MICROBIOLOGIA APLICADA**

COMISIÓN DE TESIS

**DR. JESÚS ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO
DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. MARÍA PORFIRIA BARRÓN GONZÁLEZ
DIRECTORA EXTERNA**

**Dr. DRA. ALCIONE GARCIA
SECRETARIO**

**DRA. J. RUBEN MORONE RAMIREZ
VOCAL**

ÁREA DE TRABAJO

Este trabajo se desarrollo en la Universidad Autónoma de Nuevo León (Ciudad Universitaria. San Nicolás de los Garza, N.L.) en el Laboratorio de Biología Molecular, CELAES, Facultad de Ciencias Químicas y en el Laboratorio de Biología Celular, Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Ciencias Biológicas.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que me han ayudado durante la realización de esta tesis de maestría.

A mis padres Idalia y Carlos y a mi hermano Alexei por su cariño y motivación constante durante estos años de trabajo.

A la Dra. María Porfiria Barrón González, una excelente mentora, quién me motivo a elegir este proyecto y quién me ha dirigido de excepcional manera.

Al Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño, director de mi proyecto, quién me ha brindado un invaluable apoyo en el desarrollo de mi tesis.

A la Dra. María Elena Cantú, por su soporte que ha sido fundamental para permitirme concluir mi maestría.

Al comité conformado por la Dra. Alcione Garcia, la Dra. Pilar Morales Sanclaudio y el Dr. J. Ruben Morone Ramirez por sus enseñanzas y consejos.

A mis amigos por su fraternidad y aliento incondicional.

A mis compañeros de trabajo por su colaboración en cada momento que lo precise y por darme la oportunidad de ser parte de su comunidad y que los momentos de mayor tensión no fueran nada comparados con los buenos momentos vividos.

Al departamento de patología de UANL, por la realización de los cortes y de la Técnica Histológica: Hematoxilina-Eosina que fueron vitales para este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada que me permitió poder dedicarme a esta maestría de tiempo completo.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	VV
INDICE DE TABLAS	VII
ANEXOS.....	VIIII
NOMECLATURA	IIX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	7
3. HIPÓTESIS	8
4. OBJETIVO GENERAL.....	9
4.1 Objetivos específicos.....	9
5. ANTECEDENTES	10
5.1 Probióticos.....	10
5.2 Bacterias lácticas	14
5.2.1 <i>Lactobacillus</i>	14
5.2.2 <i>Bifidobacterias</i>	15
5.3 Tracto digestivo.....	16
5.4 Microbiota del tracto digestivo.....	19
5.5 Cáncer de colon y recto (CCR)	27
5.6 Estrategias terapéuticas	31
6. MATERIAL Y MÉTODO.....	34
6.1 Material biológico	34
6.2 Preparación de soluciones y medios de cultivo	34
6.2.1 Probióticos	34

6.3	Diseño experimental.....	35
6.4	Mantenimiento	36
6.5	Obtención de postbióticos.....	37
6.5.1	Liofilizado de los postbióticos	37
6.6	Análisis fisicoquímico.....	38
6.7	Línea celular	38
6.7.1	Mantenimiento <i>in vitro</i>	39
6.7.2	Congelación de la línea celular	39
6.8	Valoraciones de actividad citotóxica	39
6.9	Encapsulación	41
6.10	Bioensayo <i>in vivo</i>	42
6.10.1	Análisis histológico	44
6.10.2	Técnica histológica: Hematoxilina-Eosina	44
6.10.3	Análisis estadístico.....	45
6.11	Cuantificancion de proteínas.....	46
6.12	Ácidos grasos de los postbióticos.....	50
7.	RESULTADOS	51
7.1	Cinética de crecimiento de probióticos	51
7.2	Unidades formadoras de colonias (UFC).....	52
7.3	Liofilizados de los postbióticos.....	54
7.4	Actividad biológica sobre la línea celular HT-29	55
7.7	Resultados del bioensayo <i>in vivo</i>	58
7.8	Análisis histológico.....	59
7.9	Pruebas postanova que muestran diferencias estadísticas.....	61
7.11	Compendio de resultados de <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i>	63
8.	DISCUSIÓN	64

9. CONCLUSIONES	73
10. PERSPECTIVAS.....	74
11. DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS.....	75
12. LITERATURA CITADA.....	76
12.1 ARTÍCULOS.....	76
12.2 LIBROS	89
12.3 CAPÍTULOS DE LIBROS.....	90
12.4 TESIS	92
12.5 MATERIAL ELECTRÓNICO	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura–1	Efectos locales y sistémicos atribuidos a los postbióticos. (Imagen tomada de Aguilar-Toalá et al. (2014), modificada por Gastaldi-Elizondo D.)	13
Figura–2	Aspecto microscópico de A) <i>L. acidophilus</i> (100X) y B) <i>B. longum</i> (100X), en el que se puede apreciar la clásica división en forma de “Y”, por la cual se le conoce a este género. (Imagen tomada por Gastaldi-Elizondo D.)	16
Figura–3	Esquema de organización histológica en el intestino delgado. Imagen tomada de http://critika-dietetika.blogspot.com y modificada por C. Daniel Gastaldi-Elizondo.	18
Figura–4	Microbiota del tracto digestivo, presencia bacteriana predominante en los órganos. (Imagen tomada del Brook y modificada por C. Daniel Gastaldi-Elizondo).	20
Figura–5	Funciones metabólicas e inmunológicas del microbiota intestinal autóctona. (Imagen tomada de Bäckhed F, et al. 2012.)	22
Figura–6	Mecanismos de interacción entre el microbiota y los probióticos. El microbiota normal y los probióticos interactúan con el huésped en actividades metabólicas y en la función inmunitaria y evitan la colonización por microorganismos oportunistas y patógenos. (Imagen tomada de Guarner et al., 2017).	25
Figura–7	Mecanismos directos de acción antitumoral atribuidos a microorganismos probióticos. (Imagen tomada de J.E. Aguilar-Toalá et al y modificada por C. Daniel Gastaldi-Elizondo).	31
Figura–8	Esquema de Obtención y Liofilizado de los postbióticos.	38
Figura–9	Esquema Valoraciones de actividad citotóxica.	41
Figura–10	En la imagen se describe en A) la metodología para la encapsulación de postbióticos y en B) se aprecia el aspecto de las capsulas.	42

Figura–11	Gráfica de la cinética de crecimiento de las bacterias probióticas.	52
Figura–12	Resultado de las UFC de las bacterias probióticas.	53
Figura–13	Aspecto de los postbióticos al finalizar el proceso de liofilización.	54
Figura–14	Actividad biológica de la mezcla de postbióticos sobre la línea celular HT-29	56
Figura–15	A) cultivo control de HT-29, B) HT-29+postbiótico, C) cultivo en presencia de HT-29+doxorrubicina.	56
Figura–16	Muestras representativas de colon de los grupos de estudio. A) Pre-Tratamiento (Prebiótico antes de inducir cáncer), B) Tratamiento (Cáncer + prebiótico), C) Control (cáncer), D) Testigo (Cáncer+antineoplásico).	59
Figura–17	Imágenes representativas de tumores en colon de ratones. A) Grupo 1; ratones alimentados con L. casei BL23 / Grupo 2; con PBS (Imagen tomada de Elsa Jacouton. et al., 2017). B) Imagen tomada de Mendes, M. C. S., et al., 2018. (Imagen modificada por C. Daniel Gastaldi-Elizondo)	65
Figura–18	Cortes de tejidos cólicos de ratones. A) Imágenes representativas teñidas con H&E, tratados con PBS o BL23. (barras de escala, 100 µm.). B) Imágenes representativas teñidas con Ki67; una flecha negra indica la distribución de Ki67 dentro de la cripta.	66
Figura–19	Imágenes representativas de cortes histológicos de colon de rata. (Imagen tomada de Jorge Arroyo et al., 2008. y modificada por C. Daniel Gastaldi-Elizondo).	68
Figura–20	Valores de CI50 de posbióticos producidos por seis cepas de Lactobacillus plantarum en varias líneas de células cancerosas. (Imagen tomada de Li-Oon Chuah et al., 2019).	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla-1	Características del microbiota del tracto gastrointestinal	24
Tabla-2	Mecanismos de interacción entre probióticos y huésped. La simbiosis entre microbiota y huésped puede optimizarse mediante intervenciones farmacológicas o nutricionales en el ecosistema microbiano intestinal utilizando probióticos o prebióticos. (Tabla tomada de Guarner et al., 2017)	26
Tabla-3	Reactivos y medios empleados y descripción de su preparación	35
Tabla-4	Distribución de los grupos de ensayo.	43
Tabla-5	Comparación de resultados de UFC de los postbióticos por recuento bacteriano en placa (RBP)	53
Tabla-6	Características de los postbióticos de las cepas probióticas	55
Tabla-7	Valores IC50 de la mezcla de postbióticos	57
Tabla-8	Análisis histológico con la técnica: hematoxilina-eosina, de los cortes de colon. En la tabla se muestra de cada grupo los cortes del colon de 3 ratas (Imágenes a 400X).	60
Tabla-9	Descripción del esquema de inducción de cáncer (DMH) y tratamiento por la droga (5-FU)	61
Tabla-10	Pruebas post-anova que muestran diferencias estadísticas	61
Tabla-11	Pruebas post-anova que muestran diferencias estadísticas	62
Tabla-12	Compendio de resultados de los análisis sobre <i>L.casei</i> y <i>L. plantarum</i> .	63

ANEXOS

1 ANEXO – NMX-F-068-S-1980.....	¡Error! Marcador no definido.
2 ANEXO– NMX-F-089-S-1978.....	¡Error! Marcador no definido.

NOMECLATURA

(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de Amonio
AC	Cripta Aberrante
AIM-V	Medio de cultivo
ANOVA	Analysis of Variance
AOM	Azoxymetano
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ATCC	American Type Culture Collection
CO ₂	Dióxido de Carbono
CRC	Cáncer Colorrectal
CSF-1	Colony Stimulating Factor-1
DMH	1,2 Dimetilhidrazina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGF	Epithelial Growth Factor
EMA	Entidad Mexicana de Acreditacion
FAO	Food and Agriculture Organization
FCA	Focos de Criptas Aberrantes
FDA	Food and Drug Administration
GALT	Tejido Linfoide Asociado a Intestino
HCl	Ácido clorhídrico
H&E	Hematoxilina-Eosina
IgA	Inmunoglobulina A
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
K-ras	Kirsten-ras
MTT	Bromuro de Tetrazolio
NaCl	Cloruro De Sodio,
NMX	Normas Mexicanas

NOM	Normas Oficiales Mexicanas
ODC	Ornitina Descarboxilasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
p53	Proteína 53 kilodaltones
PBS	Phosphate Buffered Saline
Ptb	Posbiotico
Ptba	Posbiotico Lactobacillus acidophilus
PtbB	Posbiotico Bifidobacterium longum
PtbLc	Posbiotico Lactobacillus casei
PtbLp	Posbiotico Lactobacillus plantarum
SDS	Dodecilsulfato Sódico
SFB	Suero Fetal Bovino
TEMED	Tetrametiletildiamina, N,N,N',N'- tetrametiletildiamina
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
UFC	Unidad Formadora de Colonias

RESUMEN

Los probióticos son organismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas ejercen un efecto benéfico para la salud del huésped. Se ha demostrado que varias cepas probióticas ejercen efectos benéficos tanto en el microbioma endógeno como en el epitelio y el sistema inmune intestinal. Así como también se ha reportado el efecto de los probióticos sobre patologías en humanos, tales como en carcinogénesis, mutagénesis y tumores. Hay algunos datos iniciales que indican que los microorganismos probióticos pueden impedir o retrasar la aparición de ciertos tipos de cáncer. Durante las últimas 2 décadas, varios trabajos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que probióticos detoxifican y tienen propiedad antimutagénica, y concluyen que tienen efecto benéfico en cáncer colorrectal. Se ha demostrado en algunos trabajos *in vitro* que los postbióticos han presentado actividad biológica sobre protozoarios y bacterias de importancia médica. En este trabajo se utilizarán como microorganismos probióticos las bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se obtendrán los postbióticos de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum*. A los postbióticos se les realizarán un análisis fisicoquímico, obtención y caracterización de proteínas y se realizará un perfil de ácidos grasos; posteriormente se liofilizarán para preparar una solución madre y hacer diluciones 1:2 de cada probiótico, con esto, se determinarán el efecto citotóxico y/o citotástico sobre la línea tumoral de colon HT-29, mediante el método del MTT. Se pasará a modelo *in vivo* con ratas Sprague-Dawley de seis semanas de edad, y se les administrará mezcla de alimento comercial con dosis probióticos microencapsulados, y con liofilizados de postbióticos encapsulados; las ratas serán tratadas con el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH). La encapsulación será con el método del alginato de sodio al 2%. Se realizará un análisis histológico.

ABSTRACT

Probiotics are living organisms that when administered in adequate amounts exert a beneficial effect on the health of the host. It has been shown that several probiotic strains have beneficial effects on both the endogenous microbiome and the epithelium and intestinal immune system. As well as the effect of probiotics on pathologies in humans, such as carcinogenesis, mutagenesis, and tumors. Some initial data indicate that probiotic microorganisms can prevent or delay the onset of certain types of cancer. Over the past 2 decades, several in vivo and in vitro studies have shown that probiotics detoxify and have antimutagenic property and conclude that they have a beneficial effect on colorectal cancer. It has been shown in some in vitro studies that postbiotics have presented biological activity on protozoa and bacteria of medical importance. In this work the bacteria of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* will be used as probiotic microorganisms, the postbiotics of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacterium longum* will be obtained. Postbiotics will have a physicochemical analysis, protein obtaining and characterization and a fatty acid profile will be performed; subsequently they will be lyophilized to prepare a stock solution and make 1: 2 dilutions of each probiotic, with this, the cytotoxic and/or cytotoxic effect on the HT-29 colon tumor line will be determined, using the MTT method. They will be passed to the in vivo model with six-week-old Sprague-Dawley rats, and they will be administered commercial food mix with microencapsulated probiotic doses, and with lyophilization of encapsulated postbiotics; the rats will be treated with the 1,2-dimethylhydrazine (DMH) carcinogen. The encapsulation will be with the 2% sodium alginate method. A histological analysis will be performed.

1. INTRODUCCIÓN

La investigación realizada durante el siglo pasado ha demostrado que ciertos microorganismos pueden aumentar la resistencia a las enfermedades entre ellas las bacterias del ácido láctico, las cuales pueden enriquecerse en el tracto intestinal al alimentarse de carbohidratos específicos. El consumo de alimentos fermentados se ha asociado con una mejora de la salud, y las bacterias del ácido láctico (lactobacilos y biofidobacterias) se han implicado como agentes causantes de esta mejora de la salud.

El incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos en humanos ha provocado un aumento en el interés público y gubernamental en eliminar el uso sub-terapéutico de antibióticos. Un enfoque alternativo es el uso de microorganismos probióticos, sustratos prebióticos que enriquecen ciertas poblaciones bacterianas, una combinación simbiótica de prebióticos y probióticos o los postbióticos.

La FDA exige que los fabricantes de probióticos destinados al tratamiento o prevención de enfermedades que presenten una solicitud de Investigación de nuevos medicamentos. Actualmente, no se han aprobado los probióticos para usos terapéuticos. Los proveedores de atención médica interesados en el potencial terapéutico de los probióticos requieren evidencia de la eficacia de los ensayos controlados aleatorios, incluidos los datos sobre la colonización local exitosa y los resultados específicos de la cepa, e información sobre la integridad y estabilidad del producto. (Patterson, 2003.; Barrons, 2008.)

Los prebióticos se clasifican como "ingredientes alimenticios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y / o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, y así mejorar la salud del huésped" (Gibson, 1995.). Actualmente, los prebióticos más

ampliamente aceptados incluyen fructooligosacáridos y galactooligosacáridos (ISAPP, 2009). Cuando los prebióticos se combinan con los probióticos, su relación se clasifica como simbiótica. Esta combinación puede mejorar la tasa de supervivencia de los probióticos y proporcionar beneficios de salud adicionales al huésped (Collins, 1999.)

Los probióticos son complementos alimenticios “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud al huésped” (FAO/OMS, 2001). Dentro de los microorganismos probióticos se utilizan bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque no exclusivamente, también se utilizan *Saccharomyces* y *Enterococcus*, mientras que los prebióticos se describen como sustancias dietéticas no digeribles que estimulan el crecimiento de los probióticos (Schrezenmeir, 2001; Adhikari, 2003)

Por otro lado, el término postbióticos, también conocido como metabióticos, biogénicos o simplemente metabolitos/CFS (sobrenadantes libres de células); se refiere a factores solubles (productos o subproductos metabólicos) secretados por bacterias vivas o liberados después de la lisis bacteriana . Estos subproductos ofrecen beneficios fisiológicos al huésped al proporcionar bioactividad adicional (Cicenia, 2014). Tales factores solubles se han recogido de varias cepas de bacterias ; ejemplos incluyen ácidos grasos de cadena corta (SCFA), enzimas, péptidos, ácidos teicoicos, muro péptidos derivados de peptidoglucano, endo y exopolisacáridos, proteínas de la superficie celular, vitaminas, plasmógenos y ácidos orgánicos (Yao, 2011; Tsilingiri, 2013).

Aunque la importancia de los postbióticos se ha pasado por alto relativamente, la evidencia científica de sus efectos beneficiosos para la salud está aumentando progresivamente (Compare, 2017; Haileselassie, 2016; Kareem, 2014; Costa K. D, 2003; Nakamura, 2016; (Tiptiri-Kourpeti, 2016). A pesar de que los mecanismos implicados en los efectos beneficiosos para la salud de los postbióticos no están completamente aclarados, ni su composición precisa y los mecanismos subyacentes aún están bajo investigación. Los datos científicos

han proporcionado evidencia de que los postbióticos poseen diferentes propiedades funcionales que incluyen, entre otros, antimicrobianos, antioxidantes e inmunomoduladores. Estas propiedades pueden afectar positivamente la homeostasis de la microbiota y/o las vías metabólicas y de señalización del huésped, lo que afecta las reacciones fisiológicas, inmunológicas, biológicas, neurológicas, reguladoras y metabólicas específicas (Sidhu S., 2010.; Shenderov, 2013).

Hasta la fecha solo hay unos pocos informes que resumen los hallazgos sobre los postbióticos, centrándose principalmente en los de diferentes especies de *Lactobacillus* (Konstantinov, 2013; Cicienia, 2014; Patel, 2013; 2013; Tsilingiri, 2013).

La investigación realizada por (Shenderov, 2013) reveló que los postbióticos tienen capacidades favorables de absorción, metabolismo, distribución y excreción, lo que podría indicar una alta capacidad para señalar diferentes órganos y tejidos en el huésped, lo que provoca varias respuestas biológicas.

También se ha demostrado que los postbióticos pueden imitar los efectos de los probióticos sobre la salud al tiempo que evitan la administración necesaria de microorganismos vivos, que no siempre son inofensivos. Tsilingiri et al. (2012) lo demostraron, en un ensayo *ex vivo*, algunos probióticos pueden inducir una respuesta inflamatoria local que se asemeja a la respuesta inducida por *Salmonella*. Además, la preocupación teórica asociada con bacterias probióticas vivas la administración (p. ej., hinchazón y flatulencia, translocación relacionada con los probióticos y bacteriemia y fungemia, y la posible transferencia del gen de resistencia a los antibióticos) se han descrito en informes de casos, ensayos clínicos y modelos experimentales, en pacientes con enfermedades graves (p. ej., inmunosupresión, lactantes prematuros) y factores de riesgo menores (p. ej., deterioro de la barrera epitelial intestinal, administración concurrente con antibióticos de amplio espectro a los que el

probiótico es resistente) para eventos adversos (Doron y Snyderman, 2015 ; Williams, 2010).

Actualmente los probióticos se utilizan para prevenir infecciones entéricas y gastrointestinales, aunque dentro de los efectos de estos se ha demostrado en varios trabajos que estos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo, con actividades bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolifácticos, 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).

Se ha reportado el efecto sobre patologías humanas, tales como en carcinogénesis, mutagénesis y tumores ya que actúan en la absorción del mutágeno, estimulando el sistema inmunitario, inhibiendo la producción carcinógena del microbioma intestinal (Lopez Brea y Domingo, 2007). También (Screefumar O. y Hosono, 2000) demostraron que algunas cepas probióticas reducen la actividad de las enzimas procancerígenas que se sintetizan el microbioma intestinal.

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que el cáncer de colon y recto (CCR) es el 3° tipo de cancer más frecuente a nivel mundial y en México. De acuerdo al Instituto Nacional de Salud Pública, se sabe que la principal causa es la dieta (Forman *et al.*, 2004; Armstrong y Doll, 1975, y Willet, 2001).

Por lo tanto, el uso de postbióticos puede representar una alternativa válida y más segura para evitar el riesgo relacionado con las bacterias probióticas vivas, que confieren a los postbióticos cierta aplicabilidad y funcionalidad prácticas para convertirse en una estrategia prominente para tratar muchas enfermedades (Haileselassie *et al.*, 2016 ; Tsilingiri, 2013 ; Vieira, et al., 2016). En este caso el cáncer de colon y recto (CCR).

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que la ingesta de probióticos mantiene el equilibrio del microbiota del huésped y de bacterias benéficas para la salud del huésped y reduce la de bacterias nocivas, pero hay una preocupación teórica asociada con la administración de bacterias probióticas vivas.

Aunque sus mecanismos exactos no han sido completamente dilucidados aún, y solo hay unos pocos informes que resumen los hallazgos sobre los postbióticos, pero se ha demostrado que los postbióticos pueden imitar los efectos de los probióticos, y hay datos que indican que los probióticos pueden impedir o retrasar la aparición de ciertos tipos de cáncer.

Por lo cual en este trabajo se evaluará el efecto *in vitro* de los postbióticos de lactobacilos y bifidobacterias, sobre la línea tumoral HT-29 e *in vivo* sobre adenocarcinoma murino y se realizará el análisis histopatológico del tejido.

3. HIPÓTESIS

Los liofilizados de postbióticos de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum* presentan actividad anticarcinogénica *in vitro* sobre la línea tumoral HT-29, y de manera *in vivo* sobre adenocarcinoma murino.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto in vitro e in vivo del extracto liofilizado a partir de estos microorganismos (*Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum*) y evaluar el efecto mediante técnicas histopatológicas que pueda presentar el extracto en ensayos in vivo y in vitro.

4.1 Objetivos específicos

Probióticos

- Establecer la cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum*
- Obtención y liofilización de los postbióticos de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum*
- Análisis cualitativo y cuantitativo de los postbióticos para determinar concentración de proteína y ácidos grasos
- Realizar cápsulas conteniendo los postbióticos

Bioensayo *in vitro*

- Determinar la actividad citotóxica de los postbióticos liofilizados sobre la línea celular HT-29

Bioensayo *in vivo*

- Evaluar la actividad de los postbióticos liofilizados sobre adenocarcinoma murino (ratas wistar hembras de 150g).
- Realizar el análisis histológico de cortes de adenocarcinoma murino con los postbióticos liofilizados

5. ANTECEDENTES

5.1 Probióticos

Los alimentos probióticos y prebióticos se han consumido durante siglos, ya sea como componentes naturales de los alimentos o como alimentos fermentados. El interés por la microbiología intestinal y el uso dietético de prebióticos y probióticos floreció a fines de 1800 y principios de 1900. El creciente entusiasmo motivó el aislamiento de *Escherichia coli* por parte de Escherich a fines de 1800, así como la investigación activa sobre los beneficios de la alimentación de bacterias de ácido láctico y lactosa cerca del cambio del siglo 20 (Rettger and Cheplin, 1921).

Las bacterias lácticas fueron descubiertas en 1857 por Louis Pasteur, Lister reportó el aislamiento de bacterias a partir de leche ácida en 1878, Henry Tissier descubrió especies de *Bifidobacterium* en 1889, y *Lactobacillus acidophilus* fue descubierto por Moro en 1900. Elie Metchnikoff en 1908, notó la longevidad de los búlgaros que consumían yogur y en 1907, propuso que las bacterias indígenas eran dañinas y que la ingestión de bacterias de ácido láctico en el yogur tenía una influencia positiva en la salud (Stavric y Kornegay, 1995; Rolfe, 2000), así reportó 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; y Figueroa *et al.*, 2006).

Minoru Shirota en 1930 aisló una cepa de *Lactobacillus casei* de heces humanas, que posteriormente cultivó en leche, originando una bebida con características probióticas. Esto lo llevo a ser uno de los pioneros en el estudio de probióticos. Aunque las bases científicas más sólidas y los verdaderos beneficios de estas bacterias para la salud se empezaron a estudiar con mayor rigor a mediados de la década de 1980 (Figueroa *et al.*, 2006).

Desde entonces, los probióticos se han convertido en una industria multimillonaria, ayudados por su categorización como "suplementos dietéticos", que no están sujetos a una evaluación rigurosa por parte de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA). La justificación del uso de probióticos se basa en el papel regulador gastrointestinal y genitourinario desempeñado por la microflora comensal y la necesidad de restaurar este ecosistema microbiano. Dado un cambio en el pensamiento sobre los probióticos del suplemento dietético a la terapia médica, el examen de las propiedades y capacidades de estas sustancias se ha vuelto esencial.

La palabra o termino "probiótico" se acuñó hasta 1960, y fue usado para designar a las sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos (Lilly y Stillwell, 1965).

El termino "probiótico" fue inicialmente usado como antónimo de "antibiótico". Esto 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). Se describe a los probióticos como organismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso para el hospedador, precisando que ese beneficio puede ser fisiológico o para la salud (FAO/OMS, 2001; Reid *et al.*, 2003).

Hay diversas características que debe reunir una cepa microbiana para ser incluida en dicho término "probiótico". A continuación, se enumeran algunos de los requisitos con aportaciones de diversos autores (Salminen *et al.*, 1996; Dunne *et al.*, 1999; Casas y Dobrogosz, 2000; Reid *et al.*, 2003; Salminen *et al.*, 2005).

- Identificación de la cepa
- Origen humano
- Bioseguridad
- Tolerancia a las condiciones ambientales del tracto intestinal
- Adherencia al epitelio intestinal

- Producción de antibiosis
- Capacidad para actuar como interfaz metabólico
- Modificación de la respuesta biológica
- Viabilidad de la fabricación a escala comercial de productos conteniendo la o las cepas probióticas

Hasta la fecha, no se sabe de algún caso en el cual la ingestión de cepas probióticas haya dado lugar a una colonización y supervivencia duradera en un huésped. Invariablemente, los microorganismos llegan a persistir días o semanas, pero no más tiempo (Tannock *et al.*, 2000). Por lo tanto, la utilización de probióticos confiere efectos más transitorios que duraderos, por lo que parece ser necesaria una ingestión continuada.

Se sabe que las bacterias probióticas pueden incrementar la resistencia contra los patógenos intestinales mediante mecanismos antimicrobianos. Estos incluyen, pero no están limitados a la colonización competitiva, la producción de ácidos orgánicos, como ácidos láctico y acético, bacteriocinas entre otros metabolitos primarios como el peróxido de hidrógeno y el dióxido de carbono.

La producción de ácidos orgánicos por parte de las bacterias probióticas disminuye el pH intestinal y por lo tanto se inhibe el crecimiento de patógenos. Los ácidos orgánicos incrementan a su vez los movimientos peristálticos, lo que de manera indirecta remueve a los patógenos acelerando así la velocidad con la que atraviesan el intestino. El peróxido de hidrógeno producido puede funcionar a través del sistema lactoperoxidasatiocianato, haciendo que el peróxido de hidrógeno oxide al tiocianato para transformarlo en ácido hidrociánico que es perjudicial para los patógenos. El dióxido de carbono y el diacetil que son sintetizados por las bacterias ácido-lácticas inhiben el crecimiento de patógenos. Numerosas bacteriocinas, como acidofilina, lactobacilina, acidolina, lactocidina y lactolina han demostrado acción antagónica contra patógenos (**Figura-1**), (Kailasapathy y Chin, 2000).

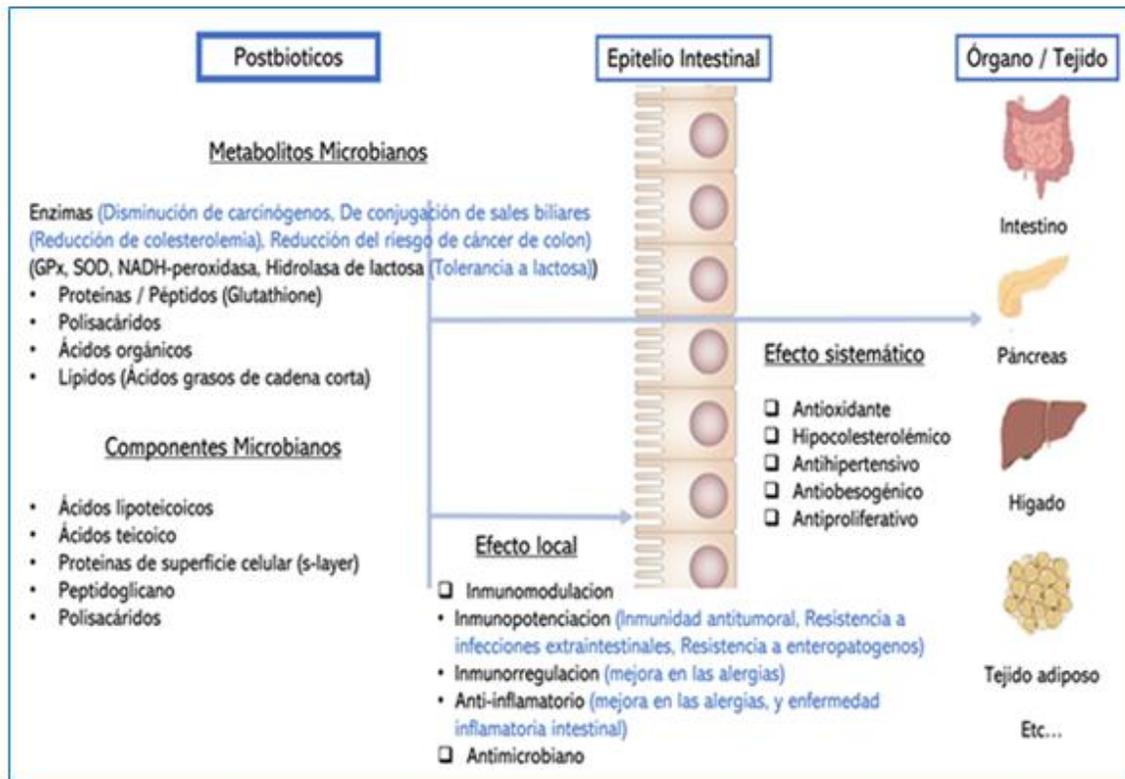


Figura 1. Efectos locales y sistémicos atribuidos a los postbióticos. (Imagen tomada de Aguilar-Toalá *et al.* (2014), modificada por Gastaldi-Elizondo D.)

La interferencia microbiana también conocida como resistencia a la colonización, que es la primera línea de defensa contra infecciones por microorganismos patógenos que causan enfermedades, es descrita como un fenómeno en el cual los microorganismos nativos o ya establecidos en un “ecosistema” previenen o impiden la colonización de microorganismos invasores en su habitat o “ecosistema”. Esto ocurre en la naturaleza, en lo particular en ecosistemas asociados con cuerpos animales, es ejercida por el microbiota y es una resistencia importante no específica para el huésped (Tannock. 1995).

5.2 Bacterias lácticas

Son bacterias Gram positivas no esporuladas que tienen en común la capacidad de producir ácido láctico por fermentación utilizando azúcares como sustrato (García-Garibay, 1996). Carecen de la capacidad de la biosíntesis del grupo hemo, por lo que 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. 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*.

5.2.1 *Lactobacillus*

Son bacilos o cocobacilos gram-positivos no esporulados, 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).

Se conocen alrededor de 56 especies del género *Lactobacillus* (**Figura–2, A**) en la actualidad, 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).

5.2.2 Bifidobacterias

Las bifidobacterias son bacilos gram-positivos, con una peculiar morfología bacilar que suele ramificarse en los extremos, anaerobios, no esporulados e inmóviles, que habitan en el tracto intestinal de animales y en aguas residuales (Prescott *et al.*, 2005; Sakata *et al.*, 2006). 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 del microbiota intestinal humana (Kó•ová *et al.*, 2006). (**Figura–2, B**)

La mayoría de las cepas 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; y Gomes y Malcata, 1999).

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 (Linder *et al.*, 2007).

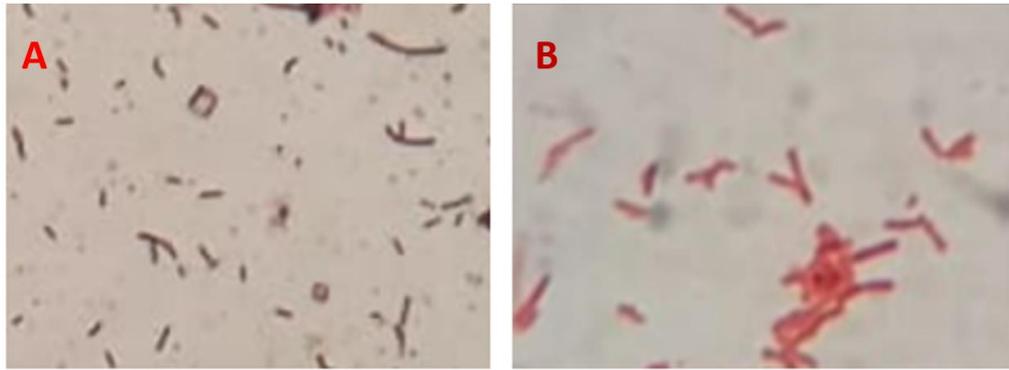


Figura 2. Aspecto microscópico de A) *L. acidophilus* (100X) y B) *B. longum* (100X), en el que se puede apreciar la clásica división en forma de “Y”, por la cual se le conoce a este género. (Imagen tomada por Gastaldi-Elizondo D.)

5.3 Tracto digestivo

El tracto o tubo digestivos está conformado por la cavidad oral, el esófago, el estómago, el intestino delgado, intestino grueso y el 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, 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, es la mayor superficie del cuerpo en contacto con el ambiente externo (entre 200 a 300m²), y está relacionada con células y tejidos inmunitarios, formando una importante línea de defensa que a su vez ofrece, nichos ecológicos para numerosos microorganismos y eficaces mecanismos antimicrobianos dando así un ecosistema complejo y dinámico (**Figura-3**) (Liévin y Servin, 2006).

Una mucosa intestinal intacta, las uniones entre los enterocitos constituyen una barrera que excluye el paso de macromoléculas y patógenos (Dotan y Mayer, 2003). Aunado a eso, las células de Paneth, las cuales son abundantes en el fondo de las criptas de Lieberkühn, protagonizan importantes funciones defensivas inespecíficas en respuesta a diversos estímulos, ya sean productos bacterianos (como lipopolisacárido, peptidoglicano y ácidos lipoteicoicos), neurotransmisores (acetilcolina) o citokinas producidas por linfocitos, lo que produce una diversidad de agentes antimicrobianos (como lisozima, defensinas, fosfolipasa A₂), citokinas 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 contra microorganismos invasores, la respuesta inflamatoria, el crecimiento de células epiteliales y otras funciones metabólicas (Keshav, 2004).

La mucosa intestinal está protegida por 2 capas de glicoconjugados unidas a la superficie celular, las glicoproteínas y los glicolípidos de la glicocálix; y por encima de éstas se encuentra la secreción de la mucosa de las células caliciformes (Freitas y Cayuela, 2000), el cual es un gel formado por mucinas, las cuales son proteínas que poseen cadenas de oligosacáridos unidos a serinas, prolinas y treoninas, representando así la parte glucídica que puede ser 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 glicosidas y esterases provenientes de las bacterias del microbiota (Freitas y Cayuela, 2000), lo que a su vez suministra nutrientes para el crecimiento bacteriano, de lo que algunos microorganismos patógenos que se adhieren al mucus también se aprovechan. (Macfarlane *et al.*, 2000).

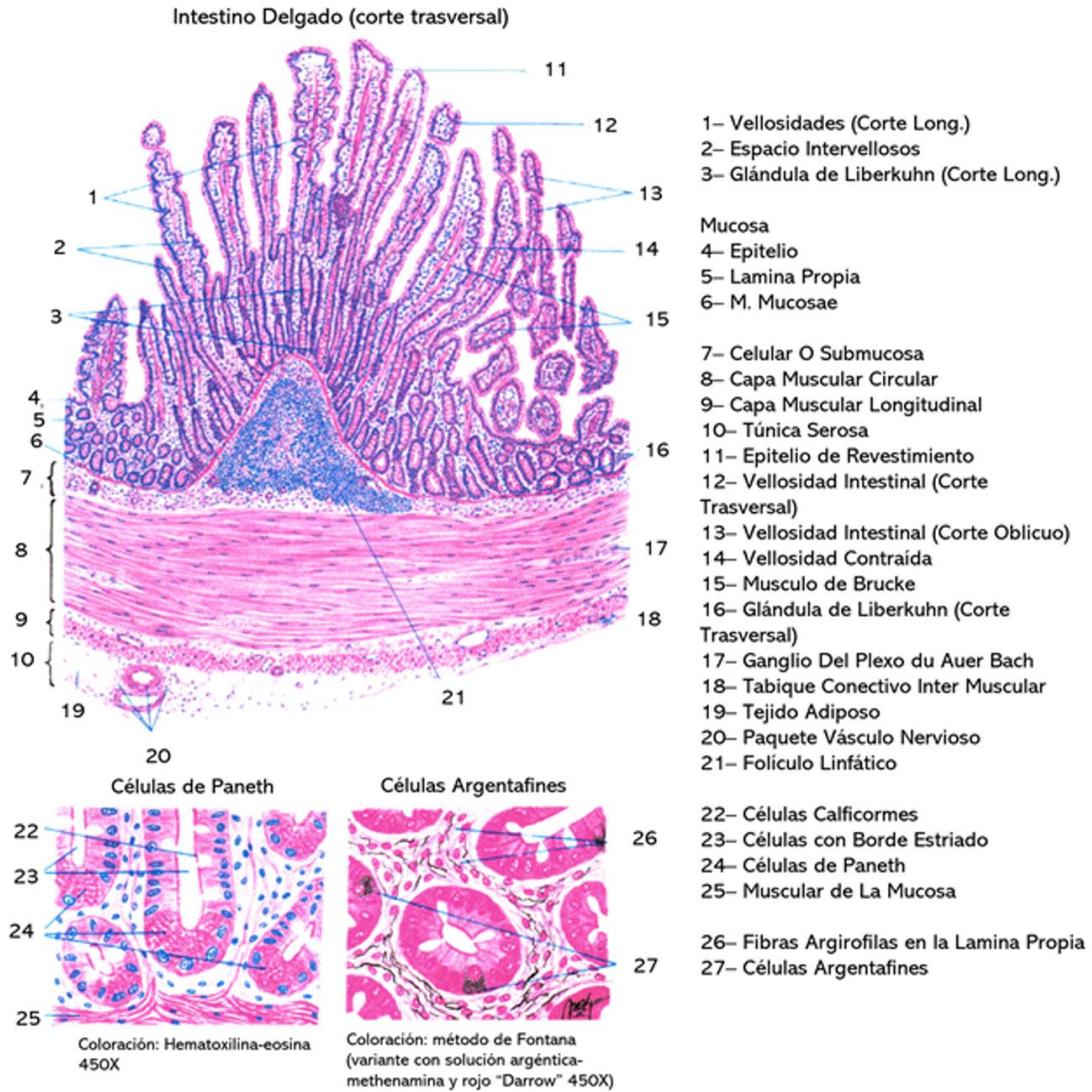


Figura 3. Esquema de organización histológica en el intestino delgado. Imagen tomada de <http://critika-dietetika.blogspot.com> y modificada por C. Daniel Gastaldi-Elizondo.

5.4 Microbiota del tracto digestivo

El microbiota se interpreta como “el conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, arqueas, virus y parásitos) que reside en nuestro cuerpo, que a su vez pueden diferenciarse en comensales, mutualistas y patógenos.” (Mansilla EC et al, 2016). Se estima que el microbiota del tracto digestivo de un adulto contiene hasta 10^{14} bacterias viables (Liévin y Servin, 2006). En el aparato digestivo, 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 pocas bacterias (10^3 UFC/mL de jugo gástrico), mientras que la concentración bacteriana aumenta a lo largo del intestino hasta llegar al colon con una concentración final de 10^{12} UFC/g.

La mayoría de las bacterias ingeridas (con saliva o en alimentos) no son capaces de sobrevivir en el estómago, dada la acidez del pH gástrico, sólo especies ácido-tolerantes como algunos estreptococcus, lactobacilos y *Helicobacter pylori* pueden sobrevivir (**Figura-4**). En el intestino delgado el pH se neutraliza, y los microorganismos viables se incrementan hasta 10^9 en el íleon; las especies presentes pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Veilonella*, *Actinomyces* y *Bacteroides*, así como a miembros de la familia *Enterobacterium*. En el intestino grueso existen anaerobios estrictos (como lo son los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* y en menor cantidad anaerobios facultativos como las enterobacterias) (Kleessen et al., 2000 y Moreau y Gaboriau, 2000).

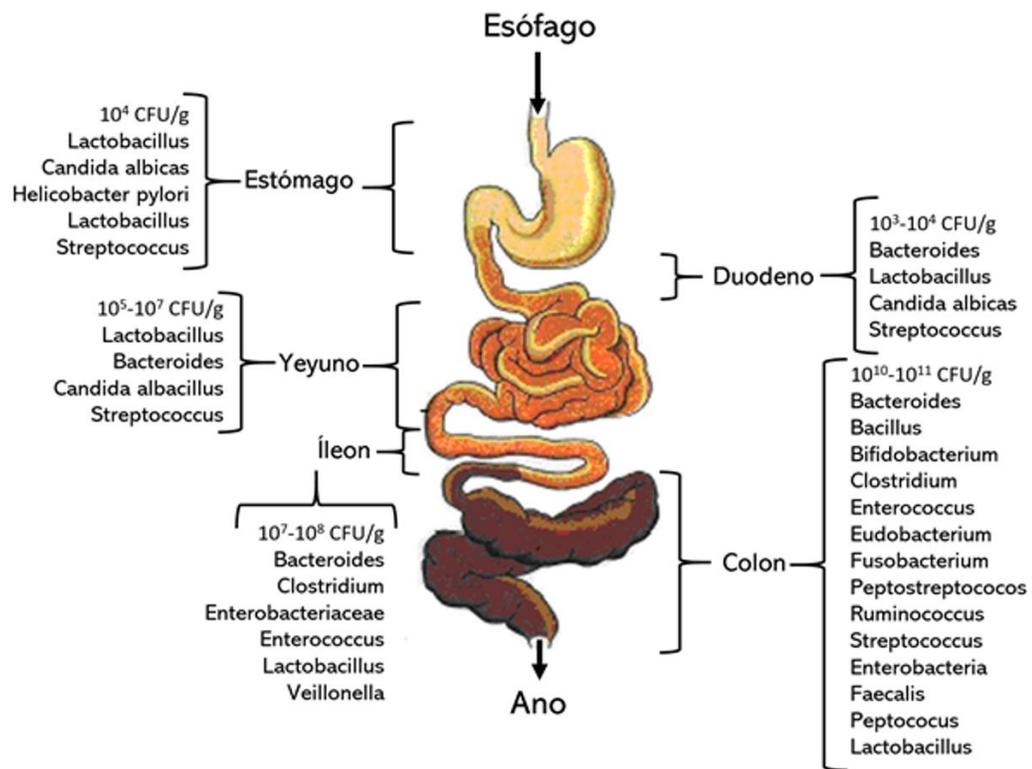


Figura 4. Microbiota del tracto digestivo, presencia bacteriana predominante en los órganos. (Imagen tomada del Brook y modificada por C. Daniel Gastaldi-Elizondo).

Algunos estudios longitudinales muestran variaciones en los recuentos de determinadas especies, como *Bacteroides thetaiotaomicron* o *Clostridium perfringens* que constituyen el microbiota intestinal (Kleessen *et al.*, 2000). Incluso posterior a perturbaciones inducidas por tratamientos antimicrobianos, las poblaciones nativas o originales retornaron (De La Cochetière *et al.*, 2005). Es importante resaltar que, la administración de prebióticos puede tener un impacto mayor sobre el microbiota que la de probióticos (Walker y Buckley, 2006); como es el caso de la administración de inulina, que incrementa el número de bifidobacterias indígenas (Gibson *et al.*, 1995).

Los microorganismos que constituyen nuestro microbioma pueden contribuir a una multitud de procesos, generalmente contribuyendo de manera beneficiosa a la homeostasis del hospedador (**Figura-5**).

Entre las funciones que son atribuidas al microbiota intestinal se pueden mencionar las siguientes: modificación del contenido intestinal (pH, potencial redox, producción de metabolitos como vitaminas y enzimas digestivas, que modulan la digestión (por ejemplo: *Oxalobacter formigis* digiere hidratos de carbono complejos) o protección de la litiasis renal o suministro de vitamina K), homeostasis intestinal y detoxificación de xenobióticos (Guarner F, *et al.*, 2011, FAO/OMS, 2002), modificaciones anatómico-funcionales del tracto digestivo (que disminuyen el volumen fecal por acción mucolítica, la tasa de renovación de enterocitos, una diferenciación de las células de la mucosa, y aceleración del tránsito intestinal), una resistencia a infecciones intestinales (por mecanismos directos como lo son la competencia por nutrientes y la producción de sustancias antibióticas, e indirectos a través de la potenciación de la inmunidad mucosal), balance energético: estudios recientes demuestran que variaciones en los microbiomas pueden tener relación con la obesidad, síndrome metabólico y diabetes mellitus, cáncer, entre otras patologías (García-García-de-Paredes A *et al.*, 2015), desarrollo del GALT (tejido linfoide asociado a intestino) (Moreau y Gaboriau, 2000; Liévin y Servin, 2006), desarrollo de los mecanismos inmunitarios, protección inmunológica e inmunotolerancia, desarrollo neurológico (García-García-de-Paredes A *et al.*, 2015).

El microbiota tiene una función importante es su contribución al desarrollo de la mucosa. Los glicoconjugados que constituyen la glicocálix de las células de la mucosa intestinal están implicados en los 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).

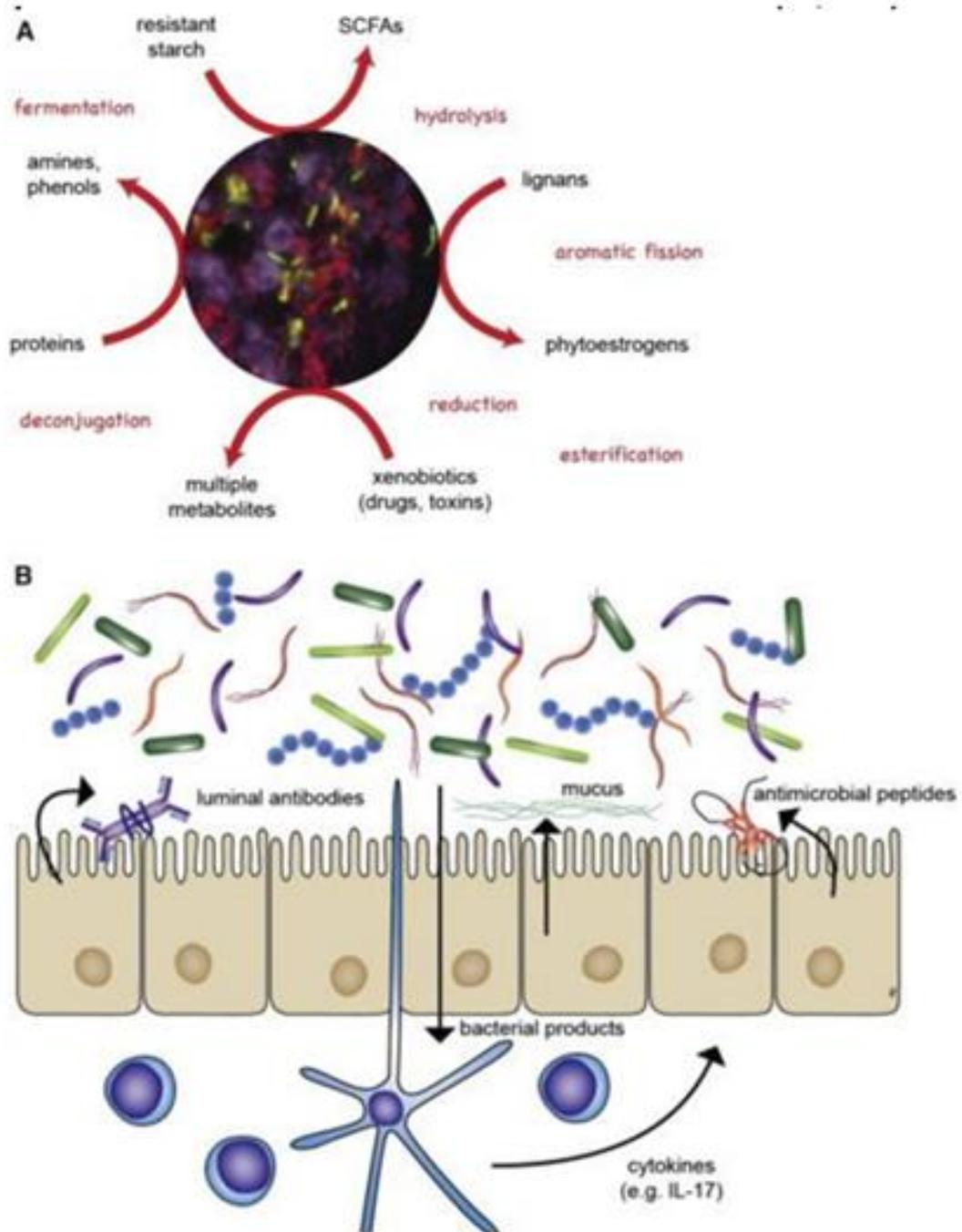


Figura 5. Funciones metabólicas e inmunológicas del microbiota intestinal autóctona. (Imagen tomada de Bäckhed F, et al. 2012.)

El microbioma intestinal siempre está activo, reanudándose aproximadamente cada 48 h. Los microorganismos intestinales comprenden en promedio 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 del microbioma intestinal.

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

El estómago y la parte superior del intestino delgado contienen pocas bacterias (**Figura-4**), ya que los alimentos transitan más rápido por esa sección, además de que la saliva contiene lisozima (que es una enzima bacteriolítica) y el pH del fluido gástrico es demasiado bajo y el de la bilis es demasiado alto. Cada región del tracto gastrointestinal posee una disposición de la población microbiana muy particular. (**Tabla- 1**) (Rastall, 2004).

El uso de probióticos afecta el ecosistema intestinal por medio de los mecanismos inmunológicos de la mucosa, interactuando con los microorganismos comensales o potencialmente patógenos, generando así productos metabólicos finales, como lo son ácidos grasos de cadena corta y enviando mensajes a las células del huésped mediante señales químicas (**Figura-6; Tabla- 2**).

Tabla 1. Características del microbiota del tracto gastrointestinal.

Región Gastrointestinal	Característica de la microflora	Ejemplos
Estómago	<ul style="list-style-type: none"> • Muy bajo número de bacterias • Presencia de anaerobios facultativos • Presencia de sólo 10^3 UFC/ml • pH ácido 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactobacilos spp.</i> • <i>Streptococos spp.</i>
Intestino	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor carga bacteriana • Presencia de anaerobios y anaerobios facultativos 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactobacilos spp.</i> • <i>Streptococos spp.</i> • <i>Bifidobacterium spp.</i> • <i>Bacteroides spp.</i> • <i>Clostridium spp.</i>
Colon	<ul style="list-style-type: none"> • La región con mayor carga bacteriana. • Presencia de 10^{11}-10^{12}(UFC)/mL • Presencia de anaerobios estrictos y facultativos en menor medida 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bifidobacterium spp.</i> • <i>Bacteroides spp.</i> • <i>Clostridium spp.</i> • <i>Peptococos spp.</i> • <i>Atopobium spp.</i>

Estos mecanismos pueden conducir a un mejoramiento del ambiente intestinal, a una regulación negativa de la inflamación y a la regulación positiva de la respuesta inmunitaria a provocaciones antigénicas como a al antagonismo de patógenos potenciales. Ya se han estudiado varias patologías digestivas, entre ellas aquellas que incluyen alteración en el equilibrio de la flora gastrointestinal, como lo son: la intolerancia a la lactosa, el síndrome de intestino irritable, las infecciones por *H. pylori* y la enfermedad inflamatoria intestinal, la diarrea asociada al uso de antibióticos, la diarrea aguda (en población pediátrica principalmente), entre muchas otras (Martínez, 2001).

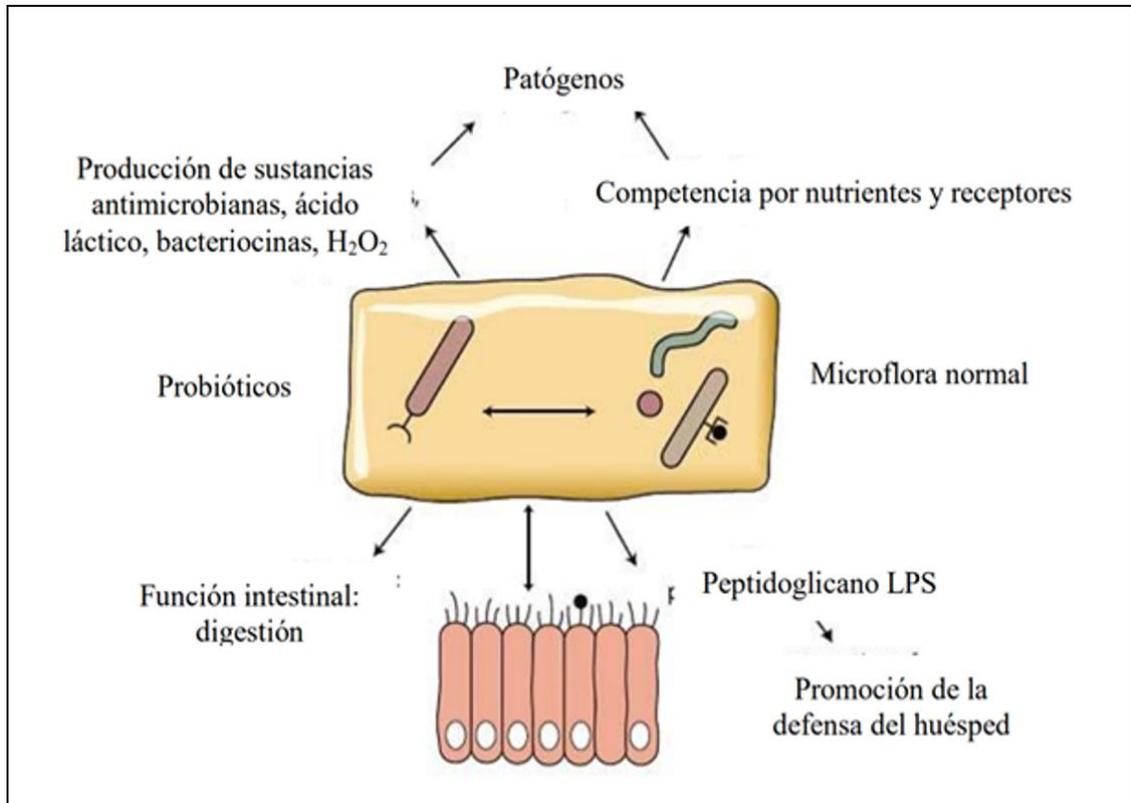


Figura 6. Mecanismos de interacción entre el microbiota y los probióticos. El microbiota normal y los probióticos interactúan con el huésped en actividades metabólicas y en la función inmunitaria y evitan la colonización por microorganismos oportunistas y patógenos. (Imagen tomada de Guarner et al., 2017).

En los últimos años, los probióticos han adquirido una considerable importancia debido a que son capaces de ejercer un beneficio sobre la salud, como por ejemplo en la prevención y 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 *Lactobacillus plantarum* como inmunomodulador; estimulando significativamente a los esplenocitos en respuesta a la concavalina A y al mitógeno de las células T (Puertollano *et al.*, 2005).

La simbiosis entre el microbiota y el huésped puede optimizarse de manera significativa mediante la intervención farmacológica o nutricional utilizando prebióticos o probióticos.

Tabla 2.
Mecanismos de interacción entre probióticos y huésped.
 (Tabla tomada de Guarner et al., 2017)

PROBIÓTICOS	ACTIVIDAD
Beneficios inmunológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Activan a los macrófagos locales para que aumenten la presentación de antígenos a los linfocitos B y que aumenten la secreción de inmunoglobulina A (IgA) tanto a nivel local como sistémico • Modulan el perfil de citoquinas • Inducen tolerancia a antígenos alimentarios
Beneficios no inmunológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Digieren el alimento y compiten con los patógenos por nutrientes • Alteran el pH local para crear un ambiente local desfavorable para los patógenos • Producen bacteriocinas que inhiben los patógenos • Eliminan los radicales superóxidos • Estimulan la producción de mucina por parte del epitelio • Mejoran la función de la barrera intestinal • Compiten por la adherencia de los patógenos • Modifican las toxinas de los patógenos

5.5 Cáncer de colon y recto (CCR)

El cáncer colorrectal (CCR) es un tumor maligno que tiene su origen en la capa más interna del intestino grueso y las causas son multifactoriales como la carga genética, factores biológicos y/o ambientales. Del 60 al 80 % de los cánceres se deben a factores relacionados con el estilo de vida, mientras que solo entre el 5 y 8 % es por factores de origen genéticos.

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015), estima que el cáncer de colon y recto (CCR) es el 3° más frecuente a nivel mundial y en México. La incidencia aumentó, ya que anteriormente se ubicaba en 4° (OMS, 2008). De acuerdo con datos del Instituto Nacional de Salud Pública, es el segundo tipo de cáncer que cobra la vida en hombres después del cáncer de próstata y el tercero en mujeres sólo después de cáncer de mama y tiroides (Globocan 2018).

En el 2018, en México se presentaron 14,900 nuevos casos de cáncer colorrectal, de los cuales, 7,795 fueron en mujeres y 7,105 en hombres. El riesgo de padecer cáncer colorrectal en el transcurso de la vida es de aproximadamente 1 en 22 lo que equivale a un 4.49% para los hombres y de 1 en 24 (4.15%) para las mujeres. Aunque la mayor prevalencia se ubica entre la población de 60 a 65 años, cada vez se reportan más casos en personas de 30 y hasta 40 años y en el país se presentan alrededor de 8 mil 700 nuevos casos cada año.

Se trata de una patología que crece exponencialmente en México y el mundo debido a malos hábitos dietéticos principalmente y el mantenimiento de costumbres perjudiciales (Tirado y Mohar, 2008). Los hábitos alimenticios de gran incidencia incluyen, pero no están limitados a: la ingesta calórica en exceso, el bajo contenido de vegetales no absorbibles (como la fibra), preferencia de carne roja, el exceso en el consumo de carbohidratos refinados

con bajo contenido de micronutrientes que dan protección. La digestión de productos que cumplen con estas características es capaz de potenciar la 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).

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 oncógenes o la inactivación de diversos genes supresores (Ruiz *et al.*, 1992).

Algunos investigadores han demostrado la propiedad detoxificante y antimutagénica de microbiota bacteriana intestinal no patógena (los probióticos) e ingredientes no digestibles (los prebióticos) con la conclusión de que ambos tienen efectos benéficos en contra del cáncer colorrectal (CRC) (Fotiadis *et al.*, 2008; Wollowski *et al.*, 2001).

A pesar de los tratamientos como lo son la cirugía, seguida por quimio y radioterapia, la tasa de éxito del tratamiento CRC sigue siendo muy variable con alta tasa de mortalidad (Liong, 2008). 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; 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).

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).

La administración de *lactobacilos* y *bifidobacterias* podría modificar el microbiota, 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).

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).

En las últimas 2 décadas, algunos estudios animales demostraron el efecto de protección que tienen los probióticos contra el cáncer colorrectal. En la administración de probióticos a ratas se encontró una 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 les induce la formación de FCA a las 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 del pH por las colonias de microorganismos que fueron responsables de inhibir el crecimiento de *E. coli* y *Clostridium*.

Kulkarni y Reddy (1994) reportaron una inhibición en la formación de FCA en el 50% de ratas tratadas bajo un esquema de alimentación con *Bifidobacterium longum*. Una investigación similar realizada por Challa *et al.* (1997) demostró una reducción del 23% de FCA y un 28% 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 proporcionó una dieta experimental anterior al tratamiento con AOM y durante el transcurso del experimento.

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.

Singh *et al.*, 1997; A partir de una investigación en ratas, llegaron a la conclusión de que AOM inducidas por la proliferación celular se inhiben con la ingestión de *B. longum* a través de una disminución de la ornitina descarboxilasa (ODC).

Aunque los probióticos promueven el crecimiento de bacterias benéficas no patógenas al reducir el pH del colon, algunas 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). Anteriormente se ha discutido que algunas cepas probióticas también pueden prevenir el daño genotóxico en el epitelio del colon (que es considerada ser una etapa temprana en el proceso carcinogénico del CCR) **(Figura-7)**.

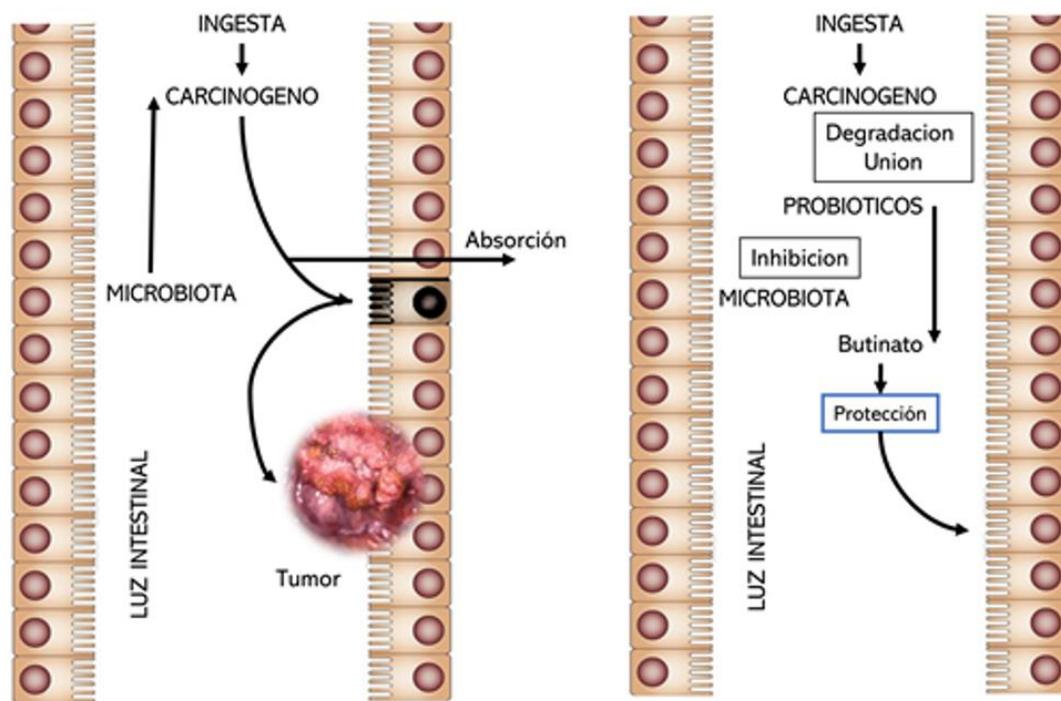


Figura 7. Mecanismos directos de acción antitumoral atribuidos a microorganismos probióticos. (Imagen tomada de J.E. Aguilar-Toalá et al y modificada por C. Daniel Gastaldi-Elizondo).

5.6 Estrategias terapéuticas

Existen 3 estrategias alimentarias que promueven el buen mantenimiento de un equilibrio saludable de la microflora intestinal, consisten en la alteración beneficiosa de su composición, mediante el incremento de las cantidades de bifidobacterias, de lactobacilos y/o de ambas, esto basado en la utilización de prebióticos, probióticos y/o simbióticos.

Los probióticos se describen como microorganismos vivos reconocidos como habitantes normales del intestino que al ser ingeridos potencian las propiedades de la flora intestinal. Los prebióticos como ingredientes alimentarios (hidratos

de carbono no digeribles) que poseen un efecto favorable sobre la flora intestinal, estimulando selectivamente el crecimiento de bacterias benéficas. Y los simbióticos como la combinación de prebióticos 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 ya sea o no un nutriente, que afecta una o varias funciones del organismo en forma específica y positiva, promoviendo algún efecto fisiológico que va más allá de su valor nutritivo tradicional, esto de acuerdo con los lineamientos de la OMS. Las estrategias terapéuticas actuales deben tomar en cuenta una terapia de interferencia microbiana, es decir, mediante la introducción de microorganismos vivos en el huésped cuya función sea estabilizar, mantener o restablecer el equilibrio del estado de salud 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 estomago al intestino y una vez en el estomago son asimilados por el organismo, brindando así un importante carácter terapéutico aparte de un alto valor nutritivo. Este tipo de cultivo está compuesto por 2 clases de bacterias, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* las cuales forman una asociación altamente productiva. Es importante señalar que para asegurar la llegada al intestino de las bifidobacterias o sus compuestos, éstas estarán más protegidas de la acción de los jugos gástricos, si son ingeridas con yogurt u otro alimento que sirva de protección.

Cuando el ser humano ingiere productos que contengan estas bacterias, éstas encuentran un hábitat adecuado en el intestino, y permanecen viables bajo condiciones normales. Se considera que la dosis diaria de bifidobacterias para mantener una dominancia en el intestino es de 10^8 a 10^9 , en estas concentraciones se puede asegurar un efecto terapéutico. 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° para mantenerse vivas. Cuando están liofilizadas, todavía en el empaque de la farmacia, entonces deben estar a 4° y en algunas presentaciones (mesófilos, termófilos y otras para la industria), bajo 0°. 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 (Jñápika y Posse, s.f.)

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

En trabajos recientes, se ha demostrado la actividad inhibitoria de los postbióticos 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.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Material biológico

Las bacterias que se emplearon en este trabajo fueron:

- *Lactobacillus plantarum* (Cepa ATCC 8014)
- *Lactobacillus casei* (Cepa ATCC 334)
- *Lactobacillus acidophilus* (Cepa ATCC 4356)
- *Bifidobacterium longum* (Cepa ATCC 15707)

Además, se empleó:

- Línea celular HT-29 (se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection, 1994).
- Suero fetal bovino (Se obtuvo del catálogo de la ATCC, al igual que el medio AIM-V), así como los antibióticos empleados (penicilina-estreptomicina) y el DMSO (Dimetil-sulfoxido).
- Ratas Winstar hembras (150 gr)

6.2 Preparación de soluciones y medios de cultivo

La preparación de las soluciones y medios de cultivo a emplear en el desarrollo de este trabajo se describen en la **Tabla-3**.

6.2.1 Probióticos

Preparación de medio de cultivo de probióticos MPT.

Medio MPT-caldo y MPT-agar: se preparó de acuerdo con las indicaciones mencionadas por Barrón *et al.*, 2008.

Tabla 3. Reactivos y medios empleados y descripción de su preparación

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 disuelve 0.1g de citrato férrico de amonio en (CFA) 10 mL de agua bidestilada desionizada; y se mantiene en refrigeración en un frasco ámbar a 4°C, hasta su empleo. Se esteriliza por medio de filtración
Hidróxido de sodio (10N)	Se disuelven 40g de hidróxido de sodio (NaOH) en 100mL de agua bidestilada desionizada
Solución salina (0.85%)	Se disuelven 0.85g de cloruro de sodio (NaCl) en 100mL de agua bidestilada desionizada y se ajusta a pH7.0. Se esteriliza 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 adquirirá en Aceso-Lab. GIBCO®
Suero fetal bovino inactivado	Se adquirirá en Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA. GIBCO®. Se inactiva colocándolo en un baño de calentamiento a 56°C durante 30 minutos. Se mantiene en refrigeración a 4°C
Tripsina-EDTA	Se adquirirá en Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
DMSO	Se adquirirá en Probiotek
Azul de trypan	Se adquirirá en Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA. Se prepara pesando 0.2g y se afora a 100mL con agua destilada. Se esteriliza por filtración y se almacena en refrigeración a 4°C
Doxorrubicia HCl	Se adquirirá de Zurich Pharma, en solución de 10 mg. Se le agregan 10 mL de agua destilada y ésta será la solución madre
Bromuro de Tetrazolio (MTT)	El MTT se disuelven PBS a una concentración de 5mg/mL a temperatura ambiente. La solución se esteriliza por filtración y se almacena en refrigeración a 4°C
MPT-agar	Se prepara 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 prepara 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 adquirirá en Praxair

6.3 Diseño experimental

Se evaluó a los postbióticos de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum* en un sistema *in vivo*. Los tratamientos de postbióticos encapsulados en alginatos, y microorganismos encapsulados en alginato; se dosificaron como tratamiento previo y durante el curso de la afección.

En el modelo *in vitro* se empleó la línea celular HT-29 y se evaluó la actividad citotóxica estableciendo tres eventos independientes por triplicado.

6.4 Mantenimiento

Las cepas de probióticos se mantuvieron en refrigeración a 4°C en caldo, cada cepa se activó tomando 500µL y se suspendió en 5mL de caldo para probióticos, se incubaron por 24-48h a 37°C.

Para la activación de cada cepa de bacterias y el mantenimiento de las mismas, se tomó bajo condiciones de esterilidad 0.5mL del cultivo de la cepa de las bacterias ácido lácticas en tubos borosilicato de 13x100mm conteniendo 5mL de caldo y otros tubos con caldo, se incubaron a 37°C/18 h, posteriormente bajo condiciones de esterilidad se tomaron con una asada de cada cultivo y se sembraron por estría en tres tubos de borosilicato de 13x100mm conteniendo 5mL de medio-agar inclinado y otros tubos conteniendo medio-agar inclinado, se incubaron a 37°C/24 h, enseguida se guardaron a 4°C por no más de tres meses.

6.5 Obtención de postbióticos

Los probióticos se reactivaron antes de iniciar cada bioensayo. A un litro de medio-caldo MPT se le inocula 1% de cultivo de cada uno de los probióticos (incubado por 24h a 37°C dependiendo de cada cepa) se incubaron a 37°C por 48h.

El cultivo se colocó en frascos especiales y se centrifugo 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 realiza la prueba de esterilidad, tomando una alícuota y colocándola en medio-caldo para probióticos, se incuba a 37°C por 48h y una vez aprobada dicha prueba de esterilidad, el sobrenadante estéril fue el medio con los factores extracelulares de los probióticos o también llamado postbiótico.

6.5.1 Liofilizado de los postbióticos

El sobrenadante filtrado se congeló por 24 h a -20°C y posteriormente se llevó la muestra de los postbióticos 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. (Figura–8)

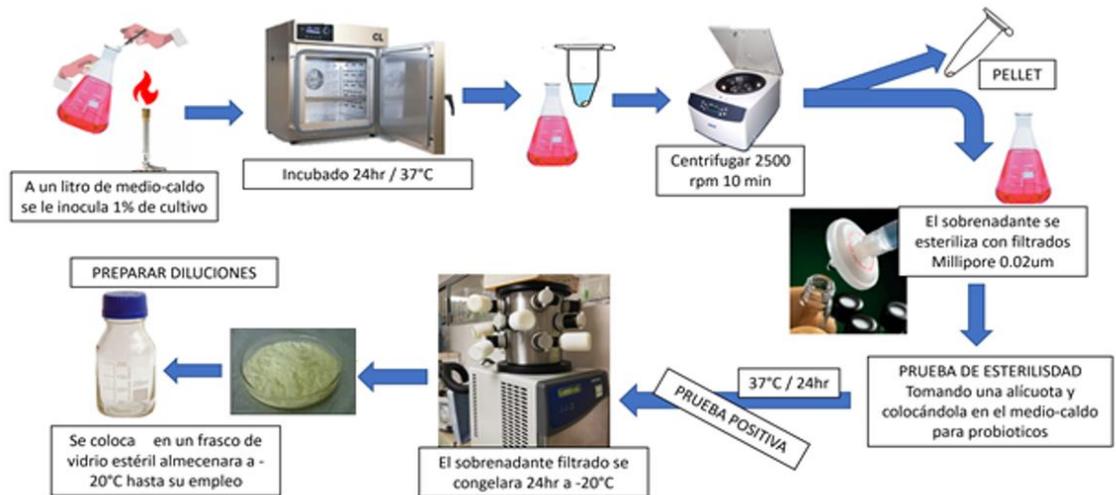


Figura 8. Esquema de obtención y liofilizado de los postbióticos.

6.6 Análisis fisicoquímico

A los postbióticos se les realizó un análisis fisicoquímico, en el cual se determinó la proteína y extracto etéreo basándose en la metodología de las normas oficiales mexicanas NMX-F-068-S-1980 (**ANEXO-1**) y NMX-F-089-1978 (**ANEXO-2**) respectivamente.

6.7 Línea celular

La línea celular se obtuvo de la "ATCC" (American Type Culture Collection, 1994). Las células fueron adaptadas a un crecimiento *in vitro*, en medio AIM-V.

6.7.1 Mantenimiento *in vitro*

Las células tumorales se mantuvieron en el medio AIM-V suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda, conteniendo un 5% de CO₂ en frascos de 25cm³ (Corning, New York, USA).

6.7.2 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 de cultivo, 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 fuera requerido.

6.8 Valoraciones de actividad citotóxica

Las células HT-29 de cáncer de colon humano que se encuentren en crecimiento exponencial, con un 90% de confluencia, se lavaron con solución de fosfatos (PBS) y posteriormente se trató con una solución de tripsina

0.025%-EDTA 0.03% durante 5 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 inocularán 2×10^4 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 del liofilizado de postbióticos de cada probiótico sobre las placas de 96 pozo 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 de cultivo, como control positivo de crecimiento. Como control negativo de crecimiento, se colocó Doxorubicina HCl a una concentración de 100µg/mL y pozos sin células, pero con tratamiento como blancos.

Para evaluar el efecto citotóxico del compuesto, se empleo el método fluorométrico indirecto de reducción del MTT (3-(4,5-dimeltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolio bromuro), se agregó a cada pozo 15 µL de MTT (0.5 mg/mL), se incubó por cuatro horas y posteriormente se agregó a cada pozo 80 µL de DMSO y se leyó a 570 nm de absorbancia en un lector de microplacas.

El uso de la rezarsurina permite determinar si se trata de una actividad citotóxica. Después de la valoración de citotoxicidad, se retiró el medio con rezasurina y se reemplazó por 100µL por pozo del medio AIM-V + 5% SFB y se incubó por 48 hs. Se siguió el procedimiento descrito para evaluar la actividad citotóxica y se obtuvieron las curvas de porcentaje de supervivencia en función del logaritmo de la concentración. **(Figura–9).**

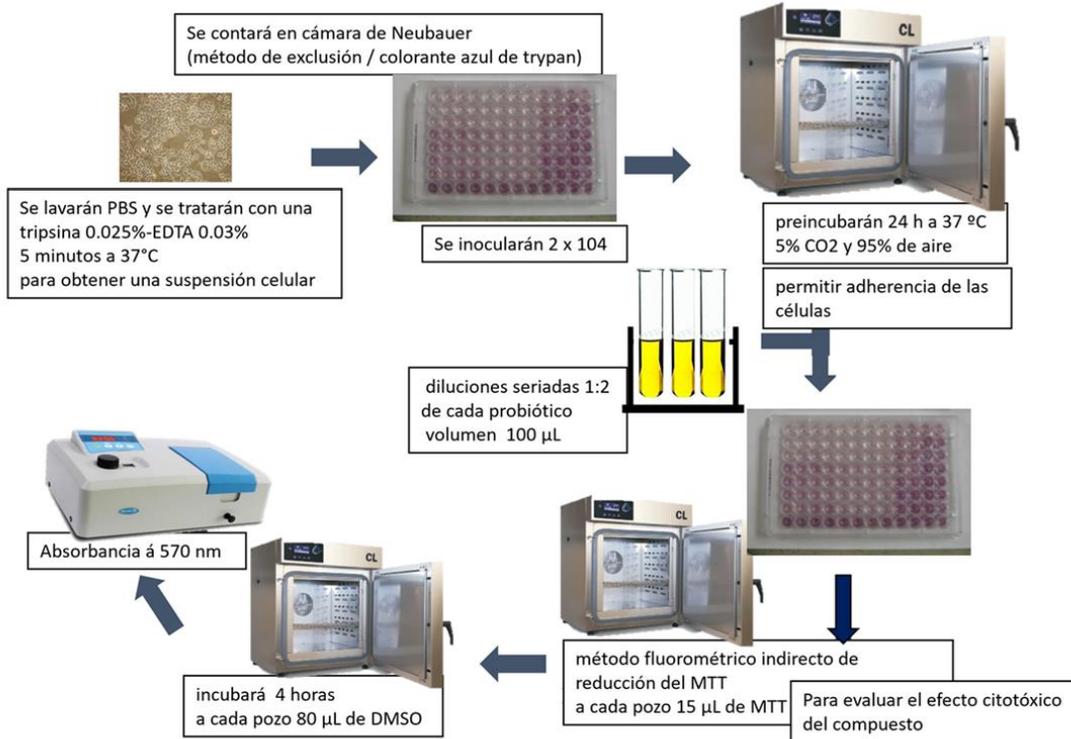


Figura 9. Esquema Valoraciones de actividad citotóxica.

6.9 Encapsulación

La técnica empleada fue con alginato de sodio al 2% como soporte de inmovilización (Durán, 1997; y Cruz, 2007). Se preparó la solución de alginato de sodio, se esterilizó y posteriormente se mezcló con el liofilizado de postbióticos (LPtb).

Las cápsulas se obtuvieron por goteo de la mezcla a través de una aguja en caída libre de una solución de CaCl₂ (0.2 M), las cápsulas se dejaron por 20 minutos para permitir que se polimericen y se almacenaron a 3°C con solución de agua peptonada al 0.03%. **(Figura–10).**

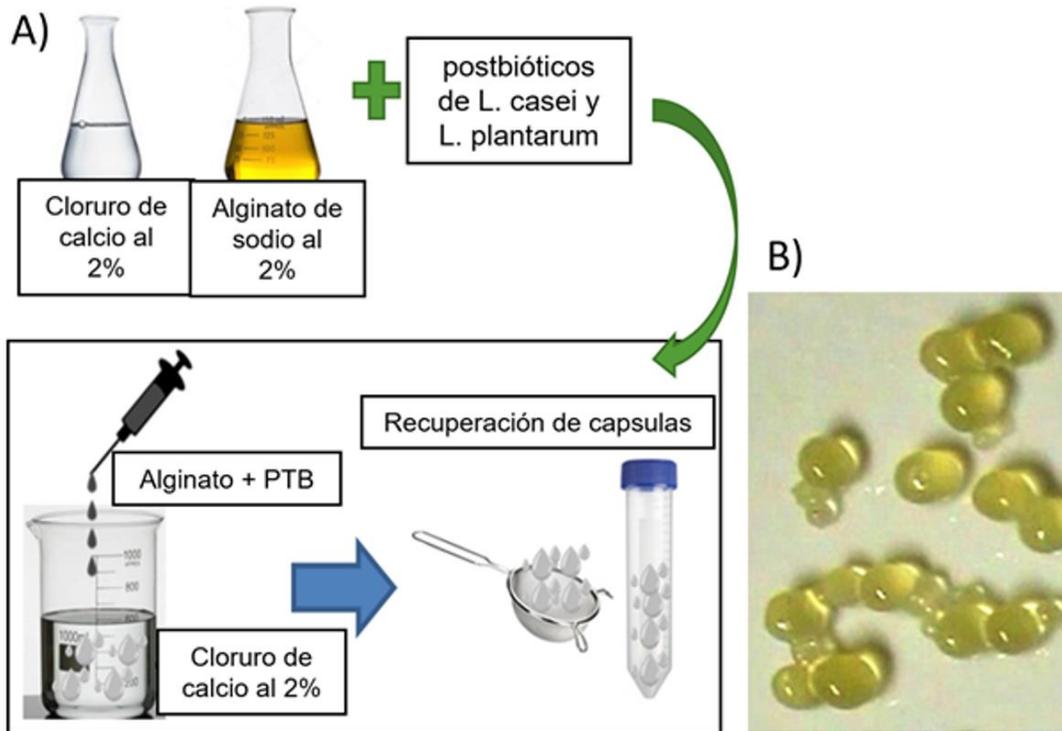


Figura 10. En la imagen se describe en A) la metodología para la encapsulación de postbióticos y en B) se aprecia el aspecto de las capsulas.

6.10 Bioensayo *in vivo*

Se utilizaron ratas hembra Winstar de seis semanas de edad. Las ratas fueron divididas en cinco grupos. Como se observa en la **Tabla-4**.

NOTA: Todos los animales fueron tratados según lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

Tabla 4. Distribución de los grupos de ensayo.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	
Esquema de alimentación:	Pre-Tratamiento (Postbióticos antes de inducir cáncer y recibir tratamiento químico)	Tratamiento al cáncer (cáncer + postbióticos)	Tratamiento durante todo el bioensayo con postbióticos	Control (cáncer)	Testigo (sin cáncer ni droga)	Control (cáncer tratado con droga)
	Dieta comercial molida + postbióticos encapsulados	Dieta comercial molida + postbióticos encapsulados	Dieta comercial molida + postbióticos encapsulados	Dieta comercial molida	Dieta comercial molida	Dieta comercial molida y un antineoplásico (para disminuir el avance del cáncer)
	Se induce cáncer y recibe tratamiento químico. Después de cáncer ya no recibe capsulas + postbióticos	Hasta inducir cáncer, se integra a la dieta las cápsulas con postbióticos, hasta el momento del sacrificio.	Inicia el tratamiento desde el destete y durante el curso del cáncer y hasta el momento del sacrificio.	Desde el destete, se induce cáncer y hasta el momento de sacrificio solo recibe dieta comercial.	Desde el destete y hasta el momento de sacrificio.	Desde el destete sólo recibe dieta comercial, se induce cáncer y sigue con el mismo tratamiento hasta el momento de sacrificio.

Nota: N= 12 individuos por grupo
Droga 5-FU o 5-fluorouracilo

Para generar el cáncer en los animales, después de cuatro semanas se les administro el carcinógeno 1,2 dimetilhidrazina DMH (21 mg/kg de peso corporal disuelta en 0.37 mg/ml EDTA, 0.9% NaCl) vía subcutánea, una vez por semana durante ocho semanas.

A los animales del grupo 2 se les administró (por 9 semanas después del tratamiento con el carcinógeno) la dieta comercial molida más los postbióticos encapsulados; y, probióticos encapsulados (los cuales previamente mostraron actividad citotóxica *in vitro*), y se registró el peso corporal de los animales semanalmente.

Las ratas se sacrificaron a las 17 semanas después de la primera inyección con DMH, bajo anestesia con éter y se sometieron a una autopsia para la disección y análisis de los tejidos. El colon fue retirado y se abrió longitudinalmente. Se lavó con una solución salina fisiológica fría.

6.10.1 Análisis histológico

Se disectaron los tumores y se fijaron durante 24h en formalina neutra, los tejidos fueron deshidratados con alcohol, transparentados con xilol y embebidos en parafina, posteriormente se realizaron los cortes histológicos de 8µm en micrótopo y finalmente los cortes histológicos fueron teñidos en hematoxilina-eosina y se analizaron al microscopio óptico.

6.10.2 Técnica histológica: Hematoxilina-Eosina

El tejido se conserva en formol al 10% para cortes histológicos, con el fin de determinar las características por una tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E). Los tejidos se deshidratan para procesarlos en parafina, esto es mediante un procesador de tejidos (Lipshaw Automatic Tissue Processor) de la siguiente manera:

El tejido permanece en formol 10% por 12 hr y el alcohol etílico al 80% por 1 h, luego alcohol etílico al 96 %, se realizaron 3 cambios cada hora y media, luego Xileno, 2 cambios cada 1.5 hr y finalmente, parafina a 60°C, en 2 cambios cada hora y media y al final se colocan los tejidos en moldes cúbicos hasta enfriar.

Después de 24 hr, se colocó en cama de hielo para efectuar los cortes, con un espesor de 4 µm, posteriormente se colocaron en un portaobjetos, cubriéndolos con un gel a base de huevo y glicerol en dilución 1:1, más granos de Timol como conservador, los cortes se colocaron en una placa caliente para fundir la parafina y continuar con la tinción con H&E.

El proceso de tinción se llevó a cabo en un tren de tinción: los portaobjetos se colocan en una canastilla que se introduce en las siguientes soluciones: xileno, 5min; alcohol etílico absoluto, 3 min; alcohol etílico al 96%, 3 min; alcohol etílico al 70%, 3 min; agua destilada; hematoxilina de Harris, agua potable, alcohol acido al 1%, agua potable; solución saturada de carbonato de litio, 2 min; agua potable-eosina, agua potable, dos cambios en alcohol etílico al 96%; 3 cambios en alcohol etílico absoluto, xileno y fueron montados con resina sintética Sigma y se cubrieron con un portaobjetos quedando listos para su observación al microscopio óptico 40X y 100X (Armed Forces, 1975; Chavez *et al.*, 2011).

6.10.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió en dos pasos, el primero la determinación de la distribución de los datos obtenidos para cada variable estudiada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

En el segundo paso, para los datos con una distribución normal predominante se emplea la prueba ANOVA de una vía para evaluar el nivel de significancia de la diferencia entre la media de los grupos de los que consta el experimento (control y tratamientos).

En los casos en que se encontró diferencia entre los grupos, se empleó la prueba de Tukey para evaluar el nivel de significancia de la diferencia de la media entre los tratamientos y del grupo control contra cada uno de los tratamientos.

6.11 Cuantificación de proteínas

A) Determinación cualitativa de proteínas mediante la prueba de Biuret:

A los postbióticos obtenidos de cada cepa de *Lactobacillus* sp. y de *B. longum*. se les realizó la prueba de Biuret, para detectar la presencia o ausencia de proteínas por un método cualitativo.

Se agregaron 10 gotas de cada postbióticos en una placa de porcelana con pocillos y se les adicionó 3 gotas del reactivo de Biuret considerando como una prueba positiva la presencia de proteínas, si se observa un virre al de color violeta y si la reacción permanece azul indica que es negativo para la presencia de proteínas.

B) Curva de calibración de proteínas por el método de Bradford:

Se preparó soluciones stock de albúmina sérica bovina a concentraciones de 0.0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.00 mg/mL. de la solución de Bradford se toman 20 mL y se mezclaron 80 mL de agua bidestilada.

La solución se filtró con un papel Whatman No. 1 y el filtrado se guardó en un frasco ámbar. De la solución madre se toman 100 µL y se adicionó a un tubo de borosilicato de 13x100.

Posteriormente, se adicionó 1 mL de la solución de Bradford y se homogenizó en un vortex por 15 segundos.

Los estándares se dejaron reposar por 10 minutos, para permitir la formación del complejo colorado y pasado este tiempo, se realizó la lectura en un espectrofotómetro Spectronic Genesis 5, con una longitud de onda de 595 nm, usando celdas rectangulares desechables de poliestireno con capacidad de 1.5 mL de la marca Daigger. Para cada estándar se realizaron 5 repeticiones.

C) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford en los postbióticos (Ptb) de *Lactobacillus sp.* y *Bifidobacterium longum*

De cada uno de los PtbLc, PtbLp, PtbLa y PtbBl se tomaron 100 µL y se depositó en un tubo de borosilicate de 13x100 y se les adicionó 1 mL de la solución de Bradford diluído (1:5), se mezcló por unos segundos y se dejó reposar por 10 min, la lectura se realizó a una λ -595 nm en un espectrofotómetro Spectronic Génesis 5. El procedimiento se sometió a un control positivo (0.5 mg/mL). Para cada uno de los medios se realizaron 5 repeticiones.

D) El contenido de nitrógeno de los postbióticos de *Lacobacillus sp.* se realizará por la norma oficial NMX-F-608-NORMEX-2011

E) Cuantificación de proteínas mediante el programa para detección de proteínas del equipo Nanodrop:

La cuantificación se realizó en un NANO-DROP 2000 por triplicado y se realizó un promedio con el fin de reducir cualquier error que se pudiera haber producido en la lectura. Se tomó 1 µL del postbióticos con ayuda de una micropipeta y se colocó directamente sobre el pedestal.

Posteriormente, el brazo del aparato fue movido para cerrar, permitiendo la formación de una columna entre la muestra y el brazo. El aparato desplegó la lectura en la pantalla y se registró en la bitácora el dato obtenido.

F) Obtención de proteínas de los postbióticos por el método de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80 % de saturación:

Se tomaron 250 mL de cada uno de los postbióticos de *Lactobacillus casei* (Lc), *Lactobacillus plantarum* (Lp), *Lactobacillus acidophilus* (La) y *Bifidobacterium longum* (Bl), y se agregaron 140.26 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80 % (sulfato de amonio).

El procedimiento se realizó en un baño con hielo y se dejó en agitación por 24 horas a 4°C. Posteriormente, el contenido de los matraces se dosificó en tubos cónicos con capacidad 50 mL, éstos se llevaron a una centrífuga marca eppendorf, donde fueron centrifugados a 11,000 r.p.m por 30 minutos. Por decantación se eliminó el sobrenadante y el precipitado de proteínas con sulfato de amonio fue resuspendido en buffer de fosfatos 0.1 M a un pH 7.2.

Además, se realizó una diálisis para cada uno de los precipitados de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* usando 10 cm de longitud de la membrana (spectrapor membrane tubing por 2 Cat. D1614-11), se humedeció con agua destilada y por un extremo se ató. En el interior del tubo se agregaron 5 mL de la solución de proteína resuspendida y en el otro extremo se ligó, para evitar la salida de las proteínas.

Posteriormente, la membrana de diálisis fue introducida a la matriz elenmeyer de 500 mL con agua bidestilada y se dejó en agitación por 24 h., con cambios de agua bidestilada cada 6 h. Terminada la diálisis, se extrajo de la membrana del interior del matraz y el contenido se adicionó a un tubo cónico de 15 mL y se guardó para su posterior uso en los bioensayos. Al dializado se le realizó la prueba de Biuret, antes descrita.

G) Caracterización de proteínas por la técnica de electroforesis de Laemmli 1970.

Preparación de geles de poliacrilamida: Se realizó la electroforesis de proteínas al postbióticos de *Lactobacilli sp.* y *B. longum*, y el medio sin crecimiento de bacterias probióticas, después de la precipitación de las biomoléculas con $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ al 80% de saturación en un sistema discontinuo desnaturizante.

Este sistema está conformado por dos geles de poliacrilamida: el gel concentrador y el gel separador, que presentan diferente concentración, composición y pH.

Preparación del gel separador:

Se preparó un volumen de 9.936 mL para la fase separadora del gel. En un vaso de precipitado de 20 mL se adicionó 4.06 mL de agua tridestilada estéril, 3.21 mL de una solución stock de acrilamida/bisacrilamida al 30% de la casa comercial de Bio Rad. 2.5 mL de Tris en HCl con un ph de 8.8, 0.1 mL de SDS al 10%, las sustancias fueron mezcladas para homogenizarse, posteriormente se agregó 0.05 mL de PSA al 10% y 0.016 mL de TEMED, se mezcló y se agregó con una jeringa de 3 mL, entre las placas de vidrios previamente montadas. Se marcó el límite hasta donde la matriz de acrilamida sería vertida, se trazó una línea horizontal en el vidrio con un marcador indeleble. Para saber la ubicación exacta de la línea, se colocó el peine entre ambos vidrios y se midió entre uno y cinco centímetros (dependiendo del tamaño de la cámara) por debajo de los dientes del peine.

Se dejó polimerizar a temperatura ambiente por 15 a 30 minutos, usando como control de polimerización la solución de poliacrilamida remanente. Una vez formado el gel, se lavó la parte superior del gel varias veces con agua destilada hasta eliminar completamente los restos de acrilamida no polimerizada.

Preparación del gel concentrador:

Se mezcló 6.1 mL de agua tridestilada estéril, 1.3 mL de una solución stock de acrilamida/bisacrilamida al 30% de la casa comercial de Bio Rad, 2.5 mL TRIS en HCl con un H de 6.8, 0.1 mL de SDS al 10%, las sustancias se mezclaron en un vaso de precipitados de 20 mL, para homogenizar la mezcla. Posteriormente se adicionaron los catalizadores 0.050 mL de PSa al 10% y 0.016 mL de TEMED, se homogenizó y fueron vertidos entre las placas de vidrio con una jeringa de 3 mL, agregandoló arriba del gel separador. Inmediatamente después, se colocó el peine entre ambos vidrios secando con papel toalla los restos de poliacrilamida que llegaron a derramarse. Se dejó polimerizar la poliacrilamida a temperatura ambiente por 15 a 30 minutos

usando como control de la polimerización la solución de poliacrilamida que quedó remanente en el vaso. Una vez formado el gel, se retiró el peine cuidadosamente y se lavaron todos los pocillos ya formados con chorro suave de agua destilada.

Coloración y visualización de las bandas de proteínas empleando azul brillante de Azul de Coomasie R-250.

Terminado el tiempo de corrimiento, el gel de poliacrilamida se colocó en un recipiente de plástico de 15x15x5 cm y se agregó una solución de azul brillante de Coomasie en un volumen que cubre completamente el gel. Se dejó incubar por 15-20 min en un aparato orbital para generar movimientos rotatorios.

Decoloración del gel de poliacrilamida:

El gel de poliacrilamida teñido se colocó en un recipiente de plástico de 15x15x5 cm y se adicionó una solución preparada al 7% metano y 5% ácido acético, en un volumen que cubre completamente el gel. Se dejó incubar por 30 min en un aparato orbital para generar movimientos rotatorios. Pasado el tiempo de incubación, la solución se eliminó y se adicionó la misma cantidad de volumen para apreciar las bandas protéicas. Posteriormente, el gel se dejó incubar por 12 h con movimientos circulares constantes y se observó en un transiluminador (Transilluminator 3uVP KodaK Edas 290), que permitió la toma de la fotografía y el análisis se realizó con el programa computacional Kodak ID Image Analysis Software.

6.12 Ácidos grasos de los postbióticos

El contenido de ácidos grasos presentes en los postbióticos de cepa se realizó en un laboratorio con acreditación EMA (Entidad Mexicana de Acreditación) de acuerdo con la NOM-086-SSAI-1994.

7. RESULTADOS

7.1 Cinética de crecimiento de probióticos

En la **Figura-11** se observa la gráfica correspondiente a la cinética de crecimiento de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum*, la cual se llevó a cabo durante 12 horas mediante 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 tercera 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 1.2 nm; en contraste *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum* la lectura de absorbancia para su fase estacionaria fue de 1.6 nm. Entre las cuatro cepas probióticas no hubo diferencias significativas.

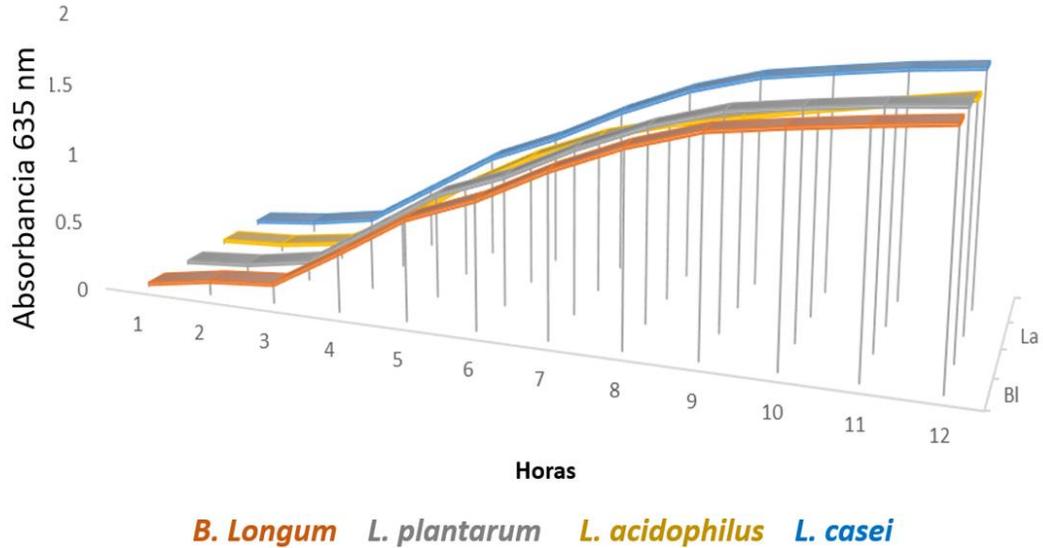


Figura 11. Gráfica de la cinética de crecimiento de las bacterias probióticas.

7.2 Unidades formadoras de colonias (UFC)

Terminadas las 12 hs de incubación a 37°C, se realizó el recuento bacteriano en placa (RBP) para determinar las unidades formadoras de colonias. En la **Figura-12** se muestran los resultados de las UFC de las distintas cepas.

Hubo una marcada diferencia significativa entre las 4 cepas, siendo *L. acidophilus* la que mostró un mayor número de UFC, como se muestra en la **Tabla-5**, 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.

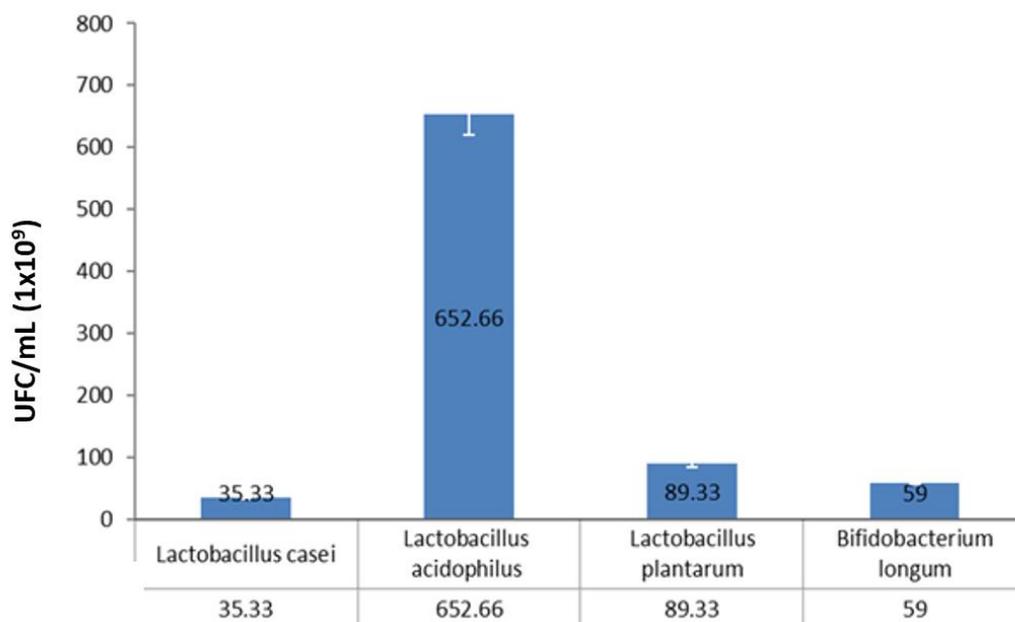


Figura 12. Resultado de las UFC de las bacterias probióticas.

Tabla 5. Comparación de resultados de UFC de los postbióticos por recuento bacteriano en placa (RBP)

Bacteria	Determinación de UFC/mL (1 x10 ⁹)
<i>L.casei</i>	35.33
<i>L. acidophilus</i>	652.66
<i>L. plantarum</i>	89.33
<i>B. longum</i>	59.00

7.3 Liofilizados de los postbióticos

Las características de los postbióticos de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum* se describen en la **Tabla-6** y se observan en la **Figura-13**, los cuales presentaron diversos aspectos desde granular hasta pegajoso.

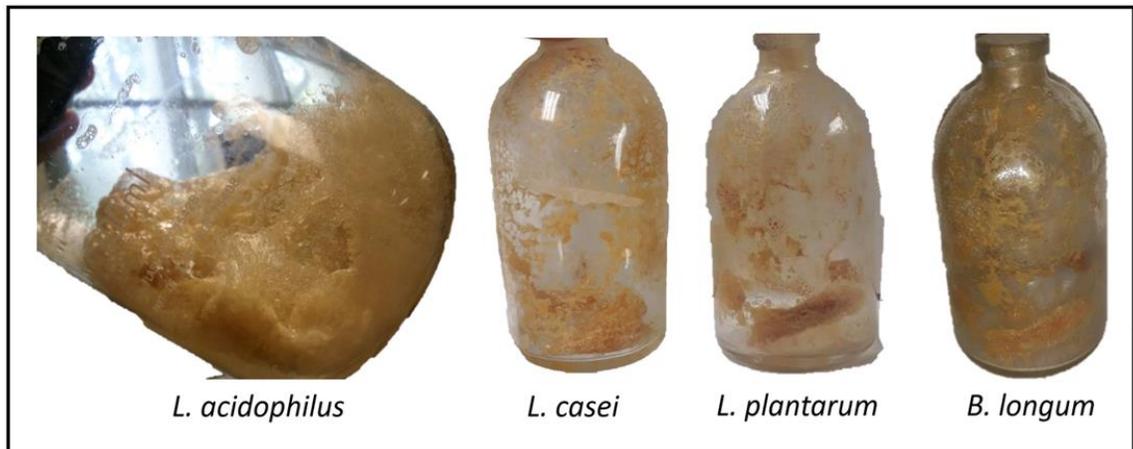


Figura 13. Aspecto de los postbióticos al finalizar el proceso de liofilización.

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.

L. casei con el menor pH, de 4.36, esta misma cepa fue la que obtuvo un color amarillo más oscuro que *L. acidophilus*, textura líquida y el mayor rendimiento, de 20g/L.

B. longum obtuvo un pH de 4.46, coloración marrón, textura pegajosa y rendimiento de 12 g/L.

Además, presentaban un olor fuerte recalcitrante, y tras pasar unos minutos a temperatura ambiente se convertían a líquido aceitoso y su color cambiaba a más oscuro. Con estas características se sugiere que la composición de los postbióticos es mayor en ácidos grasos insaturados.

Tabla 6. Características de los postbióticos de las cepas probióticas.

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

7.4 Actividad biológica sobre la línea celular HT-29

En la **Figura-14** se muestran las graficas con absorbancias (570nm) de HT-29 frente a los postbióticos 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 siete diferentes diluciones de los postbióticos, y posteriormente, se utilizó el método turbidimétrico del MTT para analizar la viabilidad de la línea celular.

Los resultados demostraron que la combinación de cepas de *L. acidophilus* y *B. longum* tuvieron mayor inhibición de la línea celular HT-29, y requiere una menor cantidad en comparación con las otras combinaciones de cepas, teniendo un efecto de inhibición de la línea celular HT-29 significativamente mayor ($p=0.05$) en comparación con las otras combinaciones de las cepas probióticas.

Los resultados obtenidos fueron similares a los ya reportados por 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 postbióticos de las cuatro cepas de probióticos utilizadas.

Asimismo, se respalda que los postbióticos de *L. acidophilus* y *B. longum* obtuvieron mejores resultados en comparación con Fotiadis *et al.* (2008).

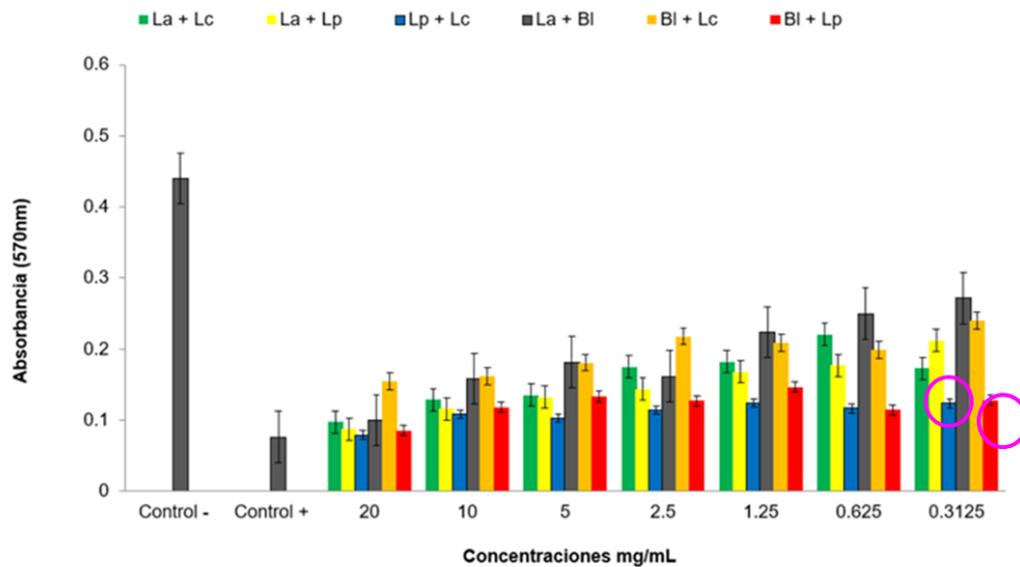


Figura 14. Actividad biológica de la mezcla de postbióticos sobre las células HT-29.

En la **Figura-15** se observa el cultivo de las células HT-29 en presencia de diversos tratamientos.

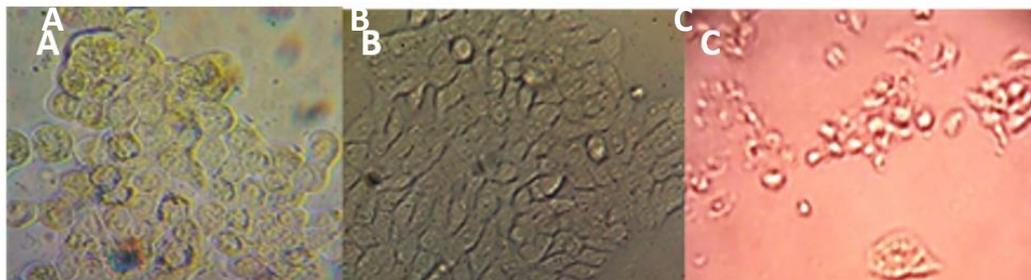


Figura 145. A) cultivo control de HT-29, B) HT-29+postbiótico, C) cultivo en presencia de HT-29+doxorubicina.

7.5 Concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) de la mezcla de postbióticos

El IC₅₀ se define como la concentración necesaria de la muestra para disminuir en un 50% la concentración inicial de los radicales libres (DPPH+), teniendo en cuenta que a menor valor de IC₅₀ es mayor la actividad. (Si el valor es >1, indica que la sustancia es citotóxica para las células tumorales, si es <1, lo contrario).

En la **Tabla-7** se muestra los valores IC₅₀ de las mezclas de los postbióticos, siendo el mas alto la mezcla de *L. acidophiuls* y *B. longum*

Estos son resultados de tres experimentos independientes por triplicado.

Tabla 7. Valores IC₅₀ de la mezcla de postbióticos.

Postbióticos	mg/mL	Interpretación
<i>L.p. + L.c.</i>	<0.001	No citotóxica
<i>B.l. + L.p.</i>	<0.001	No citotóxica
<i>L.a. + L.p.</i>	0.350	No citotóxica
<i>L.a. + L.c.</i>	0.391	No citotóxica
<i>L.a. + B.l.</i>	1.866	Citotóxica
<i>B.l. + L.c.</i>	1.566	Citotóxica

7.7 Resultados del bioensayo *in vivo*

Tras la administración del **1, 2 Dimetilhidrazina (DMH)** (como se ve en el apartado 6.10) el cual es un potente carcinógeno de colon que induce tumores colorrectales en animales de experimentación (Newell y Heddle, 2004; Saini et al., 2009) y es el modelo más ampliamente utilizado de carcinogénesis de colon químicamente inducido, por lo cual fue utilizado en este estudio.

En la **Figura-16** se muestran imágenes del colon de las ratas, después de haber sido lavado con una solución salina fisiológica fría (ver **Tabla-4**, los grupos de estudio). La pared interior del colon es examinada visualmente para el conteo y localización de placas y tumores. El tamaño de lesiones y tumores (longitud, ancho y grueso) es medido con un Vernier (Mitutoyo, 0.1 mm de graduación). En promedio el tamaño variaba entre 0.5mm a 2mm.

El cáncer de colon inducido por DMH es un proceso de varios pasos que involucra una serie de alteraciones patológicas, como la formación de focos crípticos aberrantes (lesión microscópica discreta) (Ionov *et al.*, 1993). Fiala (1975) ya informó que el metabolito activo de DMH se excreta a través de la bilis y es responsable de su efecto cancerígeno en el colon al pasar por el tracto digestivo.

El DMH se metaboliza en el hígado para formar azoximetano y metilazoximetanol, que luego se transporta al colon a través de la bilis o la sangre para generar su último metabolito cancerígeno, el ion diazonio que provoca estrés oxidativo al metilar biomoléculas de células epiteliales del colon y conduce a la proeventos mutagénicos como resultado de la inflamación y la promoción del tumor. (Oday O Hamiza, *et al.*, 2012).

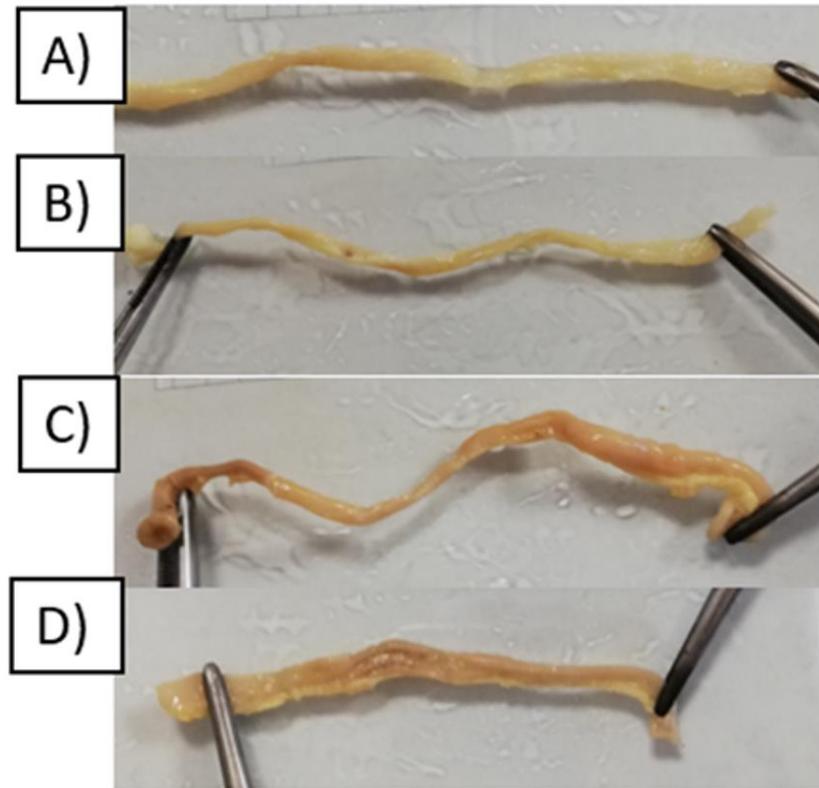
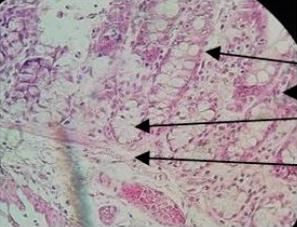
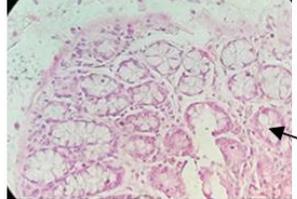
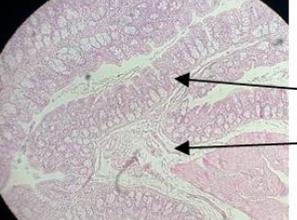
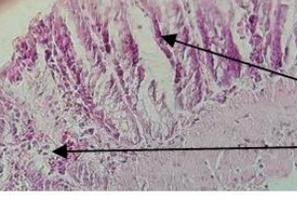
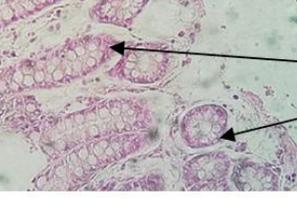
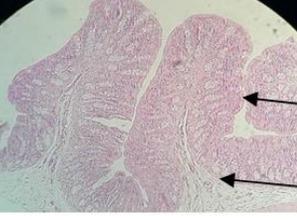


Figura 16. Muestras representativas de colon de los grupos de estudio. A) Pre-Tratamiento (Prebiótico antes de inducir cáncer), B) Tratamiento (Cáncer + prebiótico), C) Control (cáncer), D) Testigo (Cáncer + antineoplásico).

7.8 Análisis histológico

En la **Tabla-8** se muestran imágenes representativas de los cortes histológicos con la técnica de hematoxilina-eosina para cada uno de los grupos de estudio de este proyecto.

Tabla 8.
Análisis histológico de los cortes de colon de modelo murino, teñidos por la técnica de Hematoxilina-Eosina.

G	DESCRIPCIÓN	OBSERVACIÓN	DESCRIPCIÓN
1	Pre-Tratamiento (Postbiótico** antes de inducir cáncer y recibir tratamiento químico*) <u>Esquema de alimentación:</u> Dieta comercial +Postbiótico encapsulado, se induce cáncer y recibe tratamiento químico. Después de cáncer ya no recibe capsulas+postbióticos		Prevención Se observan Criptas colónicas, ligera presencia de infiltrado leucocitario y células calciformes en la estructura de las Glándulas de Lieberkuhn así como la capa mucosa.
2	Tratamiento al cáncer (cáncer + postbiótico**) <u>Esquema de alimentación:</u> Dieta comercial al destete, hasta inducir cáncer, se integra a la dieta las cápsulas con postbiótico, hasta el momento del sacrificio.		Tratamiento post cáncer Se observa mucosa colónica normal y las Glándulas de Lieberkuhn
3	Tratamiento durante todo el bioensayo con postbiótico** <u>Esquema de alimentación:</u> Dieta comercial + Postbiótico encapsulado. Inicia el tratamiento desde el destete y durante el curso del cáncer y hasta el momento del sacrificio.		Tratamiento mixto Se observan: Criptas colónicas normales Mucosa
4	Control (cáncer) <u>Esquema de alimentación:</u> Sólo recibe dieta comercial desde el destete, se induce cáncer y hasta el momento de sacrificio solo recibe dieta comercial.		Sin tratamiento Se observan: criptas aberrantes Infiltración leucocitaria
5	Testigo (sin cáncer ni droga) <u>Esquema de alimentación:</u> No se induce cáncer. Sólo recibe dieta comercial desde el destete y hasta el momento de sacrificio.		Testigo Se observan: Criptas colónicas normales Células calciformes en la estructura de las Glándulas de Lieberkuhn
6	Control (cáncer tratado con droga*) <u>Esquema de alimentación:</u> Desde el destete sólo recibe dieta comercial, se induce cáncer y sigue con el mismo tratamiento hasta el momento de sacrificio.		Alimentación Normal ● Se observan criptas colónicas normales ● Mucosa

** La mezcla de postbióticos empleada fue de *L. plantarum* + *L. casei*

Tabla 9. Descripción del esquema de inducción de cáncer (DMH) y tratamiento por la droga (5-FU)

Descripción de compuestos para el experimento <i>in vivo</i>	
Especificaciones	
Dosis DMH (Se inicia la inyección a tres semanas de la ingesta de cápsulas)	2 semanas, 2 veces a la semana: 40mg/kg
Dosis 5-FU	50mg/kg por 5 días ó 1 vez en 3

Nombre común de 5-FU: Carac, Tolak, Efudex y Fluoroplex

7.9 Pruebas postanova que muestran diferencias estadísticas

Tabla 10. Pruebas post-anova que muestran diferencias estadísticas.

Tukey HSD ^{a,b} .						
Concentración	N	Subset				
		1	2	3	4	5
20 mg/mL	18	.100593				
10 mg/mL	18	.131657	.131657			
5 mg/mL	18		.144120	.144120		
2.5 mg/mL	18		.156135	.156135	.156135	
1.25 mg/mL	18			.175495	.175495	
0.625 mg/mL	18			.179492	.179492	
0.313 mg/mL	18				.191245	
C-	18					.405889
		.148	.425	.060	.064	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 Based on observed means. The error term is Mean Square (Error)= .001
 a) Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.000
 b) Alpha = 0.05

Tabla 11. Pruebas post-anova que muestran diferencias estadísticas.

Tukey HSD ^{a,b.}					
Concentración	N	Subset			
		1	2	3	4
L.p. + L.c.	24	.146823			
B.I. + L.p.	24	.157882	.157882		
L.a. + L.p.	24		.180640	.180640	
L.a. + L.c.	24			.188986	
L.a. + B.I.	24				.218840
B.I. + L.c.	24				.220299
Sig.		.883	.225	.962	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means. The error term is Mean Square (Error)= .001

a) Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000

b) Alpha = 0.05

7.11 Compendio de resultados de *L. casei* y *L. plantarum*

En la (Tabla–11) se muestran los resultados de los análisis sobre la cepa de *L.casei* y *L. plantarum*.

Tabla 12.
Compendio de resultados de los análisis sobre *L.casei* y *L. plantarum*.

Biomolécula	Prueba	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>
Proteínas	Biuret	+	+
	Bradford (mg/mL)	0.0446 mg/mL	0.0464 mg/mL
	NMX-F-608-NORMEX-2002	2.31%	2.26%
	Nanodrop (mg/mL)	1.022 mg/mL	0.94 mg/mL
	Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ al 80% de saturación	1.98mg/mL	1.7015 mg/mL
Ac. Grasos	NOM-086-SSA1-1994 (%)	0.72%	0.76%

8. DISCUSIÓN

La utilización de postbióticos no se limita a alimentos funcionales, la supresión mediada por probióticos del cáncer o las células inflamadas también se han reportado para postbióticos (de LeBlanc A de M. *et al.*, 2005; Tsilingiri K, *et al.*, 2012; Cicienia A, *et al.*, 2014). Postbiótico de *Lactobacilos* y *Bifidobacterium* ofrecen una multitud de posibilidades para su utilización en células cancerosas y estudios inflamatorios (Soa SSY, *et al.*, 2017). Esto ofrece una alternativa más segura al tratamiento actual de radio y quimioterapias que están limitadas por las toxicidades asociadas con estas últimas terapias. En este estudio, investigamos el efecto citotóxico de postbióticos producido por tres cepas de *Lactobacilos* y una de *Bifidobacterium* sobre el cáncer de colon (línea celular HT-29) para determinar el potencial de los postbióticos como suplemento funcional y como tratamiento complementario para el cáncer.

Elsa Jacouton. *et al.*, 2017, reportaron que *Lactobacillus casei* BL23, una cepa probiótica bien conocida por sus propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas, protegió significativamente a los ratones contra el desarrollo de CCR (inducido con azoximetano y dextrano sulfato de sodio), la cepa redujo significativamente el desarrollo del tumor, ya que todos los ratones tratados estaban libres de tumor al final del experimento. Se redujo las puntuaciones histológicas y los valores del índice proliferativo. Además, reportaron que tenía un efecto inmunomodulador, mediado por la regulación negativa de la citocina IL-22, y un efecto antiproliferativo, mediado por la regulación positiva de caspasa-7, caspasa-9 y Bik. Y que el tratamiento tendió a contrarrestar la disbiosis inducida por CCR en ratones. Los ratones alimentados con *L. casei* BL23 estaban protegidos contra el desarrollo de tumores: ningún ratón en este grupo desarrolló tumores macroscópicos, en comparación con los ratones que recibieron PBS, que desarrollaron un promedio por ratón de 2.3 tumores de al menos 2 mm de diámetro. Como se muestra en la **Figura-17-A**.

Un estudio publicado en el 2018 en que se realizó un análisis in vivo en animales, a los cuales se les administró azoximetano y dextrano sulfato de sodio con el objetivo de provocar desarrollo tumoral, posteriormente a un grupo se le administró probióticos y al otro agua, por un trascurso de 60 días después de la inyección. Como resultado, el grupo al cual se le administro probióticos presento un 40% menos de tumores que el grupo al que se le administro solo agua (**Figura-17-B**) (Mendes, M.C.S., *et al.*,2018).

Esto también se demuestra en los cortes histológicos, Elsa Jacouton. *et al.*, 2017, reportaron que la cepa LB23 mostró menos daño que los ratones control y es capaz de regular negativamente la proliferación, como se observa a través de una disminución en Ki67 (un marcador del CCR estrictamente relacionado con la proliferación celular). (**Figura-18**).

Al examinar cortes histológicos de este estudio que se muestran en las imágenes de la **Tabla-8**, con lo ya reportado comparandolos con el trabajo de Jorge Arroyo *et al.*, 2008 (**Figura-19**), quienes también utilizan DMH como agente procarcinogénico, el cual se sabe sufre metabolismo en el hígado, dando como resultado un agente carcinogénico (ion diazonium), que es capaz de producir efectos tóxicos en lugares diferentes del tumor (Bobek S., *et al.*,2000). La producción de metabolitos oxigenados reactivos durante el metabolismo hepático del DMH o durante la carcinogénesis del colon está bien documentado (**Ver apartado 7.7**); muchas publicaciones también sugieren que las células tumorales producen cantidades considerables de H₂O₂, que es liberada en la circulación (Vaiyapuri M., *et al.*,2006).

En la **Figura-21**, se muestra el efecto de extracto etanólico sobre el colon de rata, en las imágenes del bloque "A" se ve la morfología normal (**ver Figura-3**) de un corte de colon de rata sin alteraciones significativas. En el bloque "B" en la imagen B.1 se observa como el DMH a afectado el tejido, disruptiendo su estructura, generando un adenocarcinoma, en cambia en la imagen 2 con la inducción del tratamiento propio de ese estudio a una baja concentracion, se

observa incremento de glándulas colónicas, un adenoma, aunque también se observa la infiltración linfocítica, la cual indica una buena respuesta del tratamiento (una infiltración linfocítica baja indica una mala acción del tratamiento y por el contrario una infiltración linfocítica alta indica una buena acción del tratamiento, entre mas linfocitos presentes mejor es la respuesta). En el bloque “C” en la imagen 1 se observa un adenocarcinoma *in situ* (doble fila de célula), porque no ha pasado la membrana basal, desmoplasia y en en la imagen 2 una disminución del adenocarcinoma glandular.

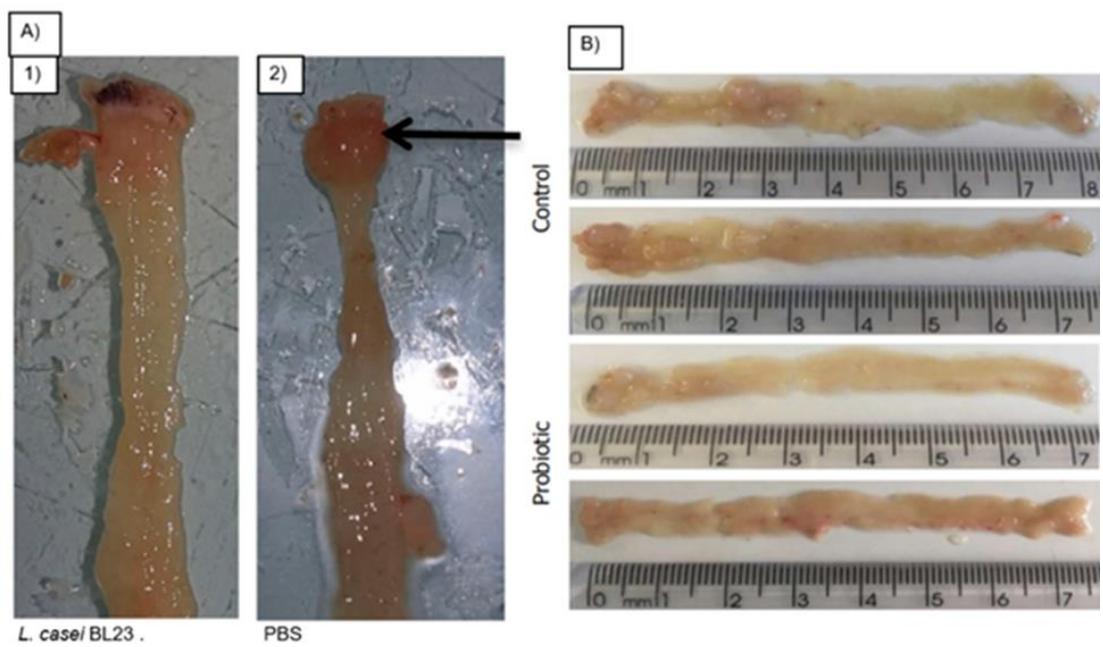


Figura 17. Imágenes representativas de tumores en colon de ratones. A) Grupo 1; ratones alimentados con *L. casei* BL23 / Grupo 2; con PBS (Imagen tomada de Elsa Jacouton. *et al.*, 2017). B) Imagen tomada de Mendes, M. C. S., et al., 2018. (Imagen modificada por C. Daniel Gastaldi-Elizondo)

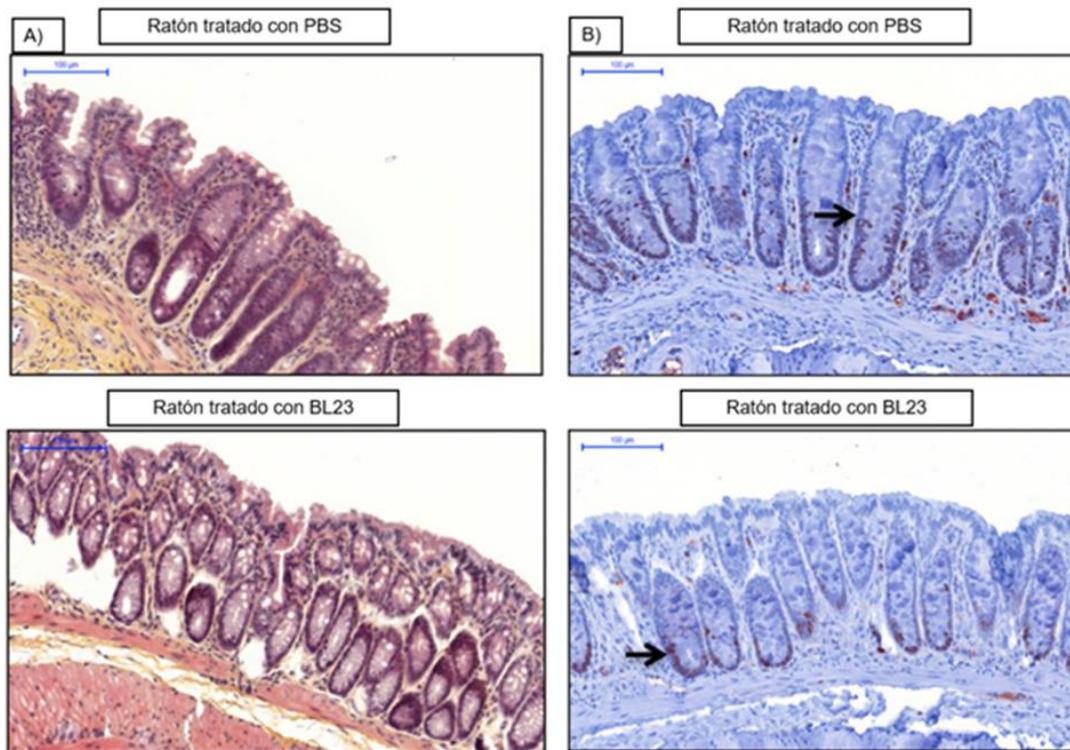


Figura 158. Cortes de tejidos cólonicos de ratones. A) Imágenes representativas teñidas con H&E, tratados con PBS o BL23. (barras de escala, 100 µm.). B) Imágenes representativas teñidas con Ki67; una flecha negra indica la distribución de Ki67 dentro de la cripta.

Estos resultados al igual que los presentados en este trabajo demuestran que el uso de probióticos y postbióticos tienen un efecto en la disminución del cáncer en colon, como se puede apreciar en la (**Figura-16, Figura-17, Figura-19, Tabla-11**). Con lo que se puede concluir que el efecto quimioprotector de las distintas dosis de los postbióticos frente a adenomas y carcinomas inducidos por DMH fue significativo, evidenciándose mejor efecto a dosis más altas y durante un mayor trascurso de tiempo, al igual que una ingesta previa a la aparición del cancer. (**Tabla-8**)

De igual manera se han utilizado modelos de células intestinales humanas *in vitro* para estudiar la función de células intestinales específicas en humanos,

como es el caso de Caco-2 y HT-29 como las líneas celulares intestinales humanas más utilizadas (Cencic, A.; et al., 2010). La línea celular de cáncer de colon parental HT-29 está compuesta principalmente de células indiferenciadas, con una pequeña minoría de células diferenciadas (~ 3% a 5% del total de células) (Liévin-Le Moal, V.; et al., 2013).

Una característica de la promoción del tumor de colon es una disminución en la integridad de la barrera epitelial. (García Lafuente; et al., 2001) Demostraron que los probióticos mejoran esta función de barrera in vivo, utilizaron *L. brevis*, mostraron una disminución en la absorción de manitol radiomarcado en la rata y (R.J. Kennedy, et al., 2000) Informan un efecto similar en ratones inactivados con interleucina 10 y alimentados con *L. plantarum* 299.

(Baricault, L.; et al., 1995) Utilizando *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium* ó una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *L. bulgaricus* redujeron significativamente la tasa de crecimiento de las células HT-29, lo que resultó en una disminución del 10% al 50% en el número total de células. Las cepas más efectivas para reducir la tasa de crecimiento de HT-29 fueron *L. helveticus* y *Bifidobacterium*.

Sin embargo, Tan et al., 2015; demostraron que las diferentes composiciones de medios de MRS reconstituido con la suplementación de polisorbato 80 afectaron significativamente los efectos citotóxicos y antiproliferativos selectivos de los postbióticos producidos por *L. plantarum* I-UL4 en células MCF-7 (cáncer de mama).

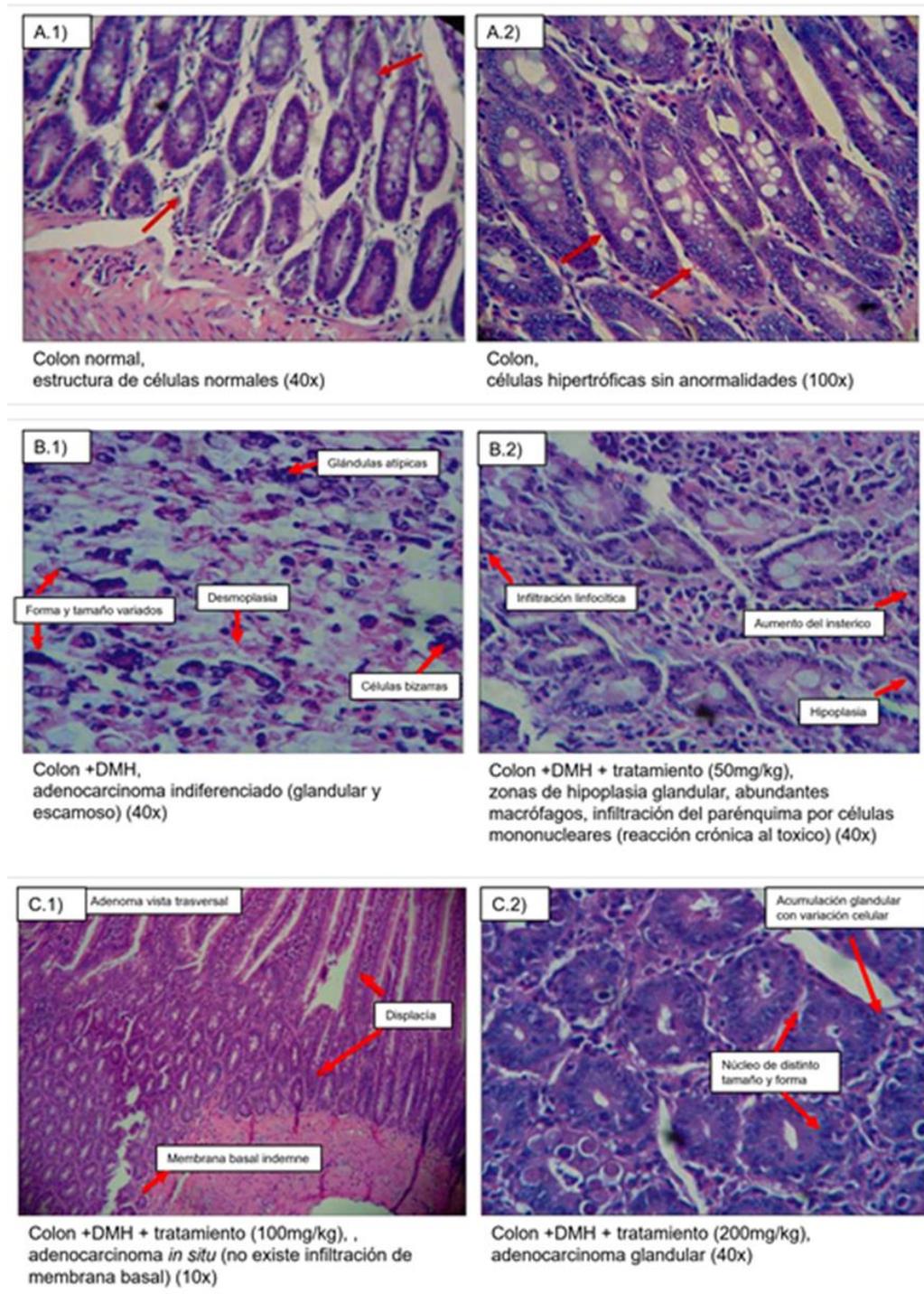


Figura 16. Imágenes representativas de cortes histológicos de colon de rata. (Imagen tomada de Jorge Arroyo et al., 2008. y modificada por C. Daniel Gastaldi-Elizondo).

(Iyer C; *et al.*, 2008) Reveló que *L. reuteri* puede participar en la vía extrínseca de apoptosis inducida por *Lactobacillus* para prevenir la aparición de cáncer colorrectal. Sin embargo, (Zhung-Yuan Chen; *et al.*, 2017) utilizando una cepa de la misma especie, *L. reuteri* BCRC14625, NO exhibió la capacidad de inducir apoptosis celular. Aunque si causa daño a la membrana celular HT-29 de acuerdo con un aumento significativo en la actividad del lactato deshidrogenasa (LDH) y la cepa BCRC17010 muestra el mejor potencial probiótico para la inhibición del crecimiento de HT-29 entre las siete cepas probadas.

Li-Oon Chuah *et al.*, 2019; demostraron que los postbióticos exhibieron un efecto citotóxico selectivo por efecto antiproliferativo e inducción de apoptosis contra las células cancerosas malignas, de una manera dependiente de la dosis y el tiempo (Shahid M, *et al.*, 2018) sin causar efectos tóxicos o hemólisis en las células normales.

La (Figura–20) muestra que los postbióticos producidos por las cepas de *L. plantarum* exhibieron un profundo efecto citotóxico a las 72 h de incubación en todas las líneas celulares de cáncer (de mama, cervical, colorrectal, hepático y leucemia), aunque diferentes valores de IC_{50} fueron exhibidos por diferentes postbióticos.

Cancer Cells	IC_{50} value of PM produced by <i>L. plantarum</i> strains, % (v/v)					
	UL4	TL1	RS5	RG14	RG11	R111
MCF-7 (ATCC*HTB-22)	10	13	21	20	16	16
HeLa (ATCC* CCL2)	20	18	24	20	N.D.	18
Hep-G2 (ATCC*HB-8065)	22	22	27	22	N.D.	N.D.
HT-29 (ATCC*HTB-38)	N.D.	N.D.	28	22	N.D.	N.D.
K562 (ATCC*CCL-240)	10	5	5	5	5	5
HL60 (ATCC*CCL-243)	5	5	9	10	1	1

Notes: Human breast cancer cells MCF-7 (ATCC-HTB-22), colorectal cancer cells HT-29 (ATCC HTB-38), cervical cancer cells HeLa (ATCC CCL2) and liver cancer cells Hep-G2 (ATCC HB-8065) are anchorage-dependent cells while leukemia cells HL60 (ATCC CCL-240) and K562 (ATCC CCL-243) are suspension cells. The highest concentration of PM being tested on all cells was 30% (v/v). The IC_{50} values were detected after 72 h of incubation. The values reported are the means of nine replicates. N.D., no IC_{50} values were detected up to the concentration of 30% (v/v)

Figura 20. Valores de IC_{50} de posbióticos producidos por seis cepas de *Lactobacillus plantarum* en varias líneas de células cancerosas. (Imagen tomada de Li-Oon Chuah *et al.*, 2019).

Además, los postbióticos exhibieron un efecto citotóxico más potente sobre las células cancerosas en suspensión como HL60 y K562 en comparación con las células cancerosas dependientes del anclaje (MCF-7, HeLa, Hep-G2 y HT-29). Lo que implica el vasto potencial de la PM como un suplemento nutracéutico alternativo que posee una actividad anticancerígena prometedora debido a su baja citotoxicidad para las células normales de mamíferos.

Esto revela los vastos potenciales de los postbióticos, sus interesantes propiedades anticancerígenas, como suplemento funcional y tratamiento complementario contra el cáncer el cual puede explorarse más a fondo.

Durante la realización de este proyecto un estudio taxonómico publicado en el “I.C.S.P.” (International Committee on Systematics of Prokaryotes), sobre el género *Lactobacillus* realizado por Jinshui Zheng et al. 2020, en el cual se evaluó la taxonomía de *Lactobacillaceae* y *Leuconostocaceae* sobre la base de secuencias completas del genoma.

El estudio divide el género *Lactobacillus* en grupos funcionalmente relevantes que compartieran ciertas propiedades fisiológicas, metabólicas y estilos de vida para facilitar los estudios funcionales y ecológicos sobre las bacterias de este género. Los parámetros que se evaluaron incluyeron filogenia del genoma central, identidad de aminoácidos promedio por pares (conservada), genes de firma específicos del clado, criterios fisiológicos y la ecología de los organismos.

Con esto *Lactobacillus* ahora se extiende a más de 25 géneros, incluidos el género modificado *Lactobacillus*, que incluye organismos adaptados al huésped que se han denominado en el grupo *L. delbrueckii*; *Paralactobacillus* así como 23 géneros nuevos, dentro de los que se encuentran *Lacticaseibacillus* y *Lactiplantibacillus*, que son los de interés para este trabajo dado que son los nuevos nombre otorgados a las bacterias utilizadas en este estudio, como se aprecia en la (Tabla 13).

Tabla 13.

Cambio de nombre del género *Lactobacillus*.

Nombre antiguo	Nombre nuevo
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-----

9. CONCLUSIONES

Los liofilizados de los postbióticos de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* contienen compuestos de naturaleza lipídica y protéica, y probablemente son los responsables de la inhibición la línea celular HT-29 bajo condiciones *in vitro*.

- La mezcla de postbióticos de *L. casei* y *L. plantarum* encapsulados inhiben significativamente la alteración histológica a nivel de colon en un modelo *in vivo*.

10. PERSPECTIVAS

En la última década los probióticos y postbióticos han adquirido importancia a nivel mundial, debido al incremento de enfermedades gastrointestinales, como: el síndrome de inflamación intestinal, infecciones intestinales bacterianas, virales, amebiasis, y en cáncer, sobre todo los que están relacionados al intestino como el cáncer de colon.

El potencial de los posbióticos presenta avances prometedores para tratar o prevenir afecciones como el cáncer de colon (al menos a nivel in vivo en modelos murinos), aun hay mucho por estudiar, pero los resultados son prometedores, dentro de las siguientes perspectivas se puede considerar lo siguiente:

Generar un fármaco a partir de los metabolitos secundarios producidos por las bacterias probióticas, sobre todo las que han mostrado mejores resultados.

Estudiar las vías de señalización en las que atacan al cáncer, y determinar que proteínas o componentes son los que intervienen en la inhibición de la proliferación celular.

11. DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS

Los residuos que se generaron durante toda la parte experimental del proyecto fueron desechados cumpliendo con el reglamento del departamento de Medio ambiente y Seguridad de la FCQ. Para ello se utilizaron los contenedores correspondientes a cada tipo de residuo los cuales fueron proporcionados por dicho departamento para posteriormente llevar a cabo las labores pertinentes de almacenaje previo a la disposición final de los residuos.

12. LITERATURA CITADA

12.1 ARTÍCULOS

- Abdel-Gawad, I.A.; el-Sayed, E.M.; Hafez, S.A.; el-Zeini, H.M.; Saleh, F.A. Inhibitory effect of yoghurt and soya yoghurt containing bifidobacteria on the proliferation of Ehrlich ascites tumor cells in vitro and in vivo in a mouse tumor model. *Br. J. Nutr.* 2004, 92, 81–86.
- Adhikari, K., Mustapha, A., & Grün, I. U. (2003). Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. *Journal of Food Science*, 68(1), 275-280.
- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105-114.
- Armstrong B. and Doll R. 1975. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *International Journal of Cancer*; 15:617-631.
- Bao G. and S. Suresh. 2003. Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nature Materials*; 2: 715–725.
- Baricault L, Denariáz G, Hourí JJ, Bouley C, Sapin C, Trugnan G, 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. E-ISSN: 19487886
- Baricault, L.; Denariáz, G.; Hourí, J.J.; Bouley, C.; Sapin, C.; Trugnan, G. 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* 1995, 16, 245–252.
- Barrón-González, M.P., Serrano Vázquez G.C., Villareal-Treviño L., Verduzco Martínez J.A., Morales Vallarta M.R., Mata Cárdenas B.D. 2008. Inhibición del crecimiento axénico in vitro de *Entamoeba histolytica* por acción de probióticos. *Ciencias UANL* 11:235-290.

- Barrons, R., & Tassone, D. (2008). Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. *Clinical therapeutics*, 30(3), 453-468.
- Barrons, R., & Tassone, D. (2008). Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. *Clinical therapeutics*, 30(3), 453-468.
- 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., Vascovo, N., Torreani, S., and Bottazzi, V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, psicology and applications. *Annual Microbiology*. 50:117-131.
- Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C. 1986. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*; 56, 930–933.
- Bobek S, Galbavy S, Mariassyova M. The effect of red beet (*Beta vulgaris* var. *rubra*) fiber on alimentary hypercholesterolemia and chemically induced colon carcinogenesis in rats. *Nahrung*. 2000; 44:184-7.
- Brady, L.J., D.D. Gallaher y F.F. Busta. 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *Journal of Nutrition* 130:410-414.
- Brandão M.M., Fontes A., and Barjas-Castro M.L. 2003. Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease. *European Journal of Haematology*; 70:207–211.
- Bujalance, C., Jiménez-Valera, M., Moreno, E., & Ruiz-Bravo, A. (2006). A selective differential medium for *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Microbiological Methods*, 66(3), 572-575.
- Busscher, H.J., Dijkstra, R.J.B., Langworthy, D.E., Collias, D.I., Bjorkquist, D.W., and Mitchell, M.D. 2008. Interaction forces between waterborne bacteria and activated carbon particles. *Journal of Colloid and Interface Science*; 322: 351–357.
- Butt, H.-J., Cappella, B., and Kappl, M. 2005. Force measurements with the atomic forcé microscope: technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports*; 59: 1–152.
- Casas, I y 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.
- Cencic, A.; Langerholc, T. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology—A review. *Int. J. Food Microbiol.* 2010, 141, 4–14.

- Challa A, Rao DR, Chawan CB, Shackelford L, 1997. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 18: 517-521.
- Chandraprabha, M.N., Somasundaran, P., and Natarajan, K.A. 2010. Modeling and analysis of nanoscale interaction forces between *Acidithiobacillus ferrooxidans* and AFM tip. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*; 75: 310–318.
- Chávez Ruvalcaba, María Isabel, Reveles Hernández Rosa Gabriela, Muñoz Escobedo José Jesús, Maldonado Tapia Claudia Herminia, Moreno García María Alejandra. 2011. Utilidad del modelo experimental de cerdo en el estudio de tratamiento de la Trichinellosis. *REDVET*. Vol 12N° 5B, pp 1-18
- Chen, Y.-Y., Wu, C.-C., Hsu, J.-L., Peng, H.-L., Chang, H.-Y., Yew, and T.-R. 2009. Surface rigidity change of *Escherichia coli* after filamentous bacteriophage infection. *Langmuir*; 25: 4607–4614.
- Chung, E., Kweon, H., Yiacoumi, S., Lee, I., Joy, D.C., and Palumbo, A.V. 2009. Adhesion of spores of *Bacillus thuringiensis* on a planar surface. *Environmental Science & Technology*; 44: 290–296.
- Cicienia, A., Scirocco, A., Carabotti, M., Pallotta, L., Marignani, M., & Severi, C. (2014). Postbiotic activities of Lactobacilli-derived factors. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 48, 18–22.
- Collins, M. D., and G. R. Gibson. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:1052S–1057S.
- Colville, K., Tompkins, N., Rutenberg, A.D., and Jericho, M.H. 2009. Effects of poly (L lysine) substrates on attached *Escherichia coli* bacteria. *Langmuir*; 26: 2639–2644.
- Commanea, D.; Hughes, R.; Shortt, C.; Rowland, I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat. Res.* 2005, 591, 276–289.
- Compare, D., Rocco, A., Coccoli, P., Angrisani, D., Sgamato, C., Iovine, B., et al. (2017). *Lactobacillus casei* DG and its postbiotic reduce the inflammatory mucosal response: An ex vivo organ culture model of post-infectious irritable bowel syndrome. *BMC*
- Costa K. D, Lee E. J., and Holmes J. W. 2003. Creating alignment and anisotropy in engineered heart tissue: role of boundary conditions in a model threedimensional culture system. *Journal of Tissue Engineering*; 9:567–577.

- Dai H., Hafner J. H., Rinzler A. G., Colbert D. T., and Smalley R. E. 1999. Nanotubes as nanoprobe in scanning probe microscopy. *Nature*; 384: 147–150.
- De La Cochetière, M.F.T., Durand, P. Lepage, A. Burreille, J.P. Galmiche and J. Dore. 2005. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *Journal of Clinical Microbiology*; 43:5588-5592.
- de LeBlanc A de M, Matar C, Thériault C, Perdígón G. Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on immune cells associated to mammary glands in normal and a breast cancer model. *Immunobiology*. 2005; 210:349–58.
- Doron, S., & Snyderman, D. R. (2015). Risk and safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 69(2), 129–134.
- Dufrêne, Y. F. 2006. Nanoscale exploration of microbial surfaces using the atomic force microscope. *Future Microbiology*; 1: 387–396.
- 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 y J.K. Collins. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76:279-292.
- Dupres, V., Alsteens, D., Pauwels, K., Dufrêne, Y.F. 2009. In vivo imaging of S-layer nanoarrays on *Corynebacterium glutamicum*. *Langmuir*; 25: 9653–9655.
- Eeckhaut, V.; van Immerseel, F.; Croubels, S.; De Baere, S.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R.; Louis, P.; Vandamme, P. Butyrate production in phylogenetically diverse Firmicutes isolated from the chicken caecum. *Microb. Biotechnol.* 2011, 4, 503–512.
- El-Nezami H., Mykkänen H., Kankaanpää P., Salminen S., Ahokas J. 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B1 from chicken duodenum. *Journal of Food Protection* 63:549-552.
- Engel, A. & Muller, D. J. 2000. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nature Structural & Molecular Biology*; 7: 715–718.
- Expressions of Tight Junction Protein Claudin-1 and Claudin-7 in Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix Lee, Jeong Won et al., *Korean Journal of Gynecologic Oncology and Colposcopy* (2004), 15 (1):41 <http://dx.doi.org/10.3802/kjgoc.2004.15.1.41>
- 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., Hursting S. D., Umar A., and Barret J.C. 2004. Nutrition and cancer prevention. *Annual Review of Nutrition*; 24:223-54.
- Fotiadis CI, Stoidis CN, Spyropoulos BG, Zografos ED, 2008. Role of probiotics, prebiotics and symbiotic in chemoprevention for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*; 14(42): 6453-6457.
- Fotiadis, D. 2003. Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature*; 421: 127–128.
- Freitas, M. and C. Cayuela. 2000. Microbial modulation of host intestinal glycosylation patterns. *Microbial Ecology in Health and Disease* 12: 165-178.
- Fritz, M., Radmacher, M., Cleveland, J.P., Allersma, M.W., Stewart, R.J., Gieselmann, R. 1995. Imaging globular and filamentous proteins in physiological buffer solutions with tapping mode atomic force microscopy. *Langmuir* 11.
- García-García-de-Paredes A, Rodríguez-de-Santiago E, Aguilera-Castro L, Ferrer-Aracil C, López-Sanromán A. Trasplante de microbiota fecal. *Gastroenterol Hepatol* 2015;38(3):123-134.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Goldsbury, C.S., Scheuring, S., and Kreplak, L. 2009. Introduction to atomic force microscopy (AFM) in biology. *Curr. Protoc. Protein Science*. Chapter 17, 17.7.1-17.7.19.
- Gomes, M.P.A. y 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.
- Grandbois, M., Clausen-Schaumann, H. & Gaub, H. 1998. Atomic force microscope imaging of phospholipid bilayer degradation by phospholipase A2. *Biophysics Journal*; 74: 2398–2404.
- Guarner et al. *Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos*. 2017.
- Guarner F, Khan AG, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, et al. *Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos*. 2011:1-29.

- Gupta V. and Garg R. 2009. Probiotics. Indian Journal of Medical Microbiology, 27: 202-209.
- Haileselassie, Y., Navis, M., Vu, N., Qazi, K. R., Rethi, B., & Sverremark-Ekström, E. (2016). Postbiotic modulation of retinoic acid imprinted mucosal-like dendritic cells by probiotic *Lactobacillus reuteri* 17938 in vitro. *Frontiers in immunology*, 7, 96.
- 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.
- Heidelmann S. R., Kaech S., Buxbaum R. E., and Matus A. 1999. Direct observations of the mechanical behaviours of the cytoskeleton in living fibroblasts. *Journal Cell Biology*; 145:109–122.
- Hertzler, S. R. and Clancy, S. M. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association* 103: 582-587.
- Hirayama, K.; Rafer, J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect* 2000, 2, 681–686.
- Hogan C., S. Dupre-Crochet, M. Norman, M. Kajita, C. Zimmermann, A. E. Pelling, E. Piddini, L. A. Baena-Lopez, J. P. Vincent, Y. Itoh, H. Hosoya, F. Pichaud and
- Hoh J. H. and C. A. Schoenenberger. 1994. *Journal Cell Science*; 107: 1105–1114.
- Hoogenboom, B. W., Suda, K., Engel, A. & Fotiadis, D. 2007. The supramolecular assemblies of voltagedependent anion channels in the native membrane. *Journal Molecular Biology*; 370: 246–255.
- Horcas I., Fernández R., Gómez-Rodríguez J. M., Colchero J., Gómez-Herrero J., Baro A.M. 2007. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review of Scientific Instruments*; 78(1):013705.
- Hosada M., Hashimoto H., He D, Morita H., Hosono A. 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.
- Informe del Grupo de Trabajo Conjunto FAO/OMS Directrices para la Evaluación de los Probióticos en los Alimentos 2002:1-29.
- J. A. Patterson and K. M. Burkholder. 2003. Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production. Department of Animal Sciences, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907. Poultry Science Association, Inc.

- Jacouton, E., Chain, F., Sokol, H., Langella, P., & Bermudez-Humaran, L. G. (2017). Probiotic strain *Lactobacillus casei* BL23 prevents colitis-associated colorectal cancer. *Frontiers in immunology*, 8, 1553.
- Janmey P. A. and R. T. Miller. 2011. *Journal Cell Science*; 124: 9–18.
- Jin H., Lewis J. L. 2004. Determination of Poisson's ratio of articular cartilage by indentation using different-sized indenters. *Journal of Biomechanical Engineering*; 126(2):138-45.
- Jones W. R., Ting-Beall H. P., Lee G. M., Kelley S. S., Hochmuth R. M., Guilak F. 1999. Alterations in the Young's modulus and volumetric properties of chondrocytes isolated from normal and osteoarthritic human cartilage. *Journal Biomechanic*; 32:119–127.
- 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.
- Kajita M., C. Hogan, A. R. Harris, S. Dupre-Crochet, N. Itasaki, K. Kawakami, G. Charras, M. Tada and Y. Fujita. 2010. *Journal Cell Science*; 123:171–180.
- Kareem, K. Y., Ling, F. H., Chwen, L. T., Foong, O. M., & Asmara, S. A. (2014). Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of *Lactobacillus plantarum* using reconstituted media supplemented with inulin. *Gut Pathogens*, 6(23) <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-23>.
- Kasas, S. 1997. *Escherichia coli* RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy. *Biochemistry*; 36: 461–468.
- Kirmizis, D. and Logothetidis, S. 2010. Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics. *International Journal of Nanomedicine* 5: 137–145.
- 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.
- 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.
- Kodera N., D. Yamamoto, R. Ishikawa and T. Ando. 2010. *Nature*; 468: 72–76.
- Konstantinov, S., Kuipers, E. & Peppelenbosch, M. Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 741–745 (2013). <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.178>

- Kulkarni N, Reddy BS, 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.
- Kunda P., A. E. Pelling, T. Liu and B. Baum. 2008. *Biomolecular research*; 18: 91–101.
- Laemmli, U. K., Beguin, F., & Gujer-Kellenberger, G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *Journal of molecular biology*, 47(1), 69-85.
- Lehenkari P. P., Charras G. T., Nykanen A., and Horton M. A. 2000. Adapting atomic force microscopy for cell biology. *Ultramicroscopy*; 82: 289–295.
- Lekka M., Laidler P., Gil D., Lekki J., Stachura Z., Hryniewicz A. Z. 1999. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *European Biophysics Journal*; 28:312–316.
- Liévin-Le Moal, V. y 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.
- Liévin-Le Moal, V.; Servin, A.L. Pathogenesis of human enterovirulent bacteria: Lessons from cultured, fully differentiated human colon cancer cell lines. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2013, 77, 380–439.
- Lilly, D. M y 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 MT, 2008. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and in-vivo evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 854-863.
- Li-Oon Chuah, Hooi Ling Foo, Teck Chwen Loh, Noorjahan Banu Mohammed Alitheen, Swee Keong Yeap, Nur Elina Abdul Mutalib, Raha Abdul Rahim and Khatijah Yusoff. Postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2019) 19:114 <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2528-2>
- Liu, S., and Wang, Y. 2010. Application of AFM in microbiology: a review. *Scanning* 32: 61–73.

- Liu, Y., Strauss, and J., Camesano, T.A., 2008. Adhesion forces between *Staphylococcus epidermidis* and surfaces bearing self-assembled monolayers in the presence of model proteins. *Biomaterials*; 29: 4374–4382.
- Lopez Brea M, Domingo D. 2007. Antibiotic therapy with probiotics. *Revista Española de Quimioterapia*; 20:170-18.
- Macfarlane, S., M. J. Hopkins and G. T. Macfarlane. 2000. Bacterial growth and metabolism on surfaces in the large intestine. *Microbial Ecology in Health and Disease*; 12:64-72.
- Mansilla EC, Moreno RC, Luisa, María Luisa Mateos Lindemann María, Lindemann M, Pérez-Castro S, Pérez-Gracia MT, et al. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Microbiota*. 59. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2016. 10. Chen WX, Ren LH, Shi.
- Martínez, M. J. 2001. Agentes probióticos y patología intestinal. *Anales Españoles de Pediatría*; 54: 15-16.
- Mei, L., Ren, Y., Busscher, H.J., Chen, Y., and van der Mei, H.C., 2009. Poisson analysis of streptococcal bond-strengthening on saliva-coated enamel. *Journal of Dental Research*; 88: 841–845.
- Mendes, M. C. S., Paulino, D. S., Brambilla, S. R., Camargo, J. A., Persinoti, G. F., & Carnevali, J. B. C. (2018). Microbiota modification by probiotic supplementation reduces colitis associated colon cancer in mice. *World journal of gastroenterology*, 24(18), 1995.
- Mennickent S. y K. Green. 2009. Los probióticos y su utilidad terapéutica. *Ciencia Ahora*; 24:31-38.
- Muller, D. J., Hand, G. M., Engel, A. & Sosinsky, G. 2002. Conformational changes in surface structures of isolated Connexin gap junctions. *EMBO Journal*; 21: 3598–3607.
- Müller, D.J., and Dufrêne, Y.F. 2008. Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. *Nature Nanotechnology*; 3: 261–269.
- Nakamura, F., Ishida, Y., Sawada, D., Ashida, N., Sugawara, T., Sakai, M., & Fujiwara, S. (2016). Fragmented lactic acid bacteria cells activate peroxisome proliferator-activated receptors and ameliorate dyslipidemia in obese mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 2549–2559.
- Ningegowda, M.A.; Gurudutt, P.S. In vitro fermentation of prebiotics by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194: Selectivity, viability and effect of metabolites on β -glucuronidase activity. *World J. Microb. Biot.* 2012, 28, 901–908.

- Oatley J.T., Rarick M.D., Ji G.E., Linz J.E. 2000. Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria in vitro. *Journal of Food Protection*; 63:1133-1136.
- Oberg, T.S., Steele, J.L., Ingham, S.C. et al. Intrinsic and inducible resistance to hydrogen peroxide in *Bifidobacterium* species. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38, 1947–1953 (2011). <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0983-y>
- Ohta, T.; Nakatsugi, S.; Watanabe, K.; Kawamori, T.; Ishikawa, F.; Morotomi, M.; Sugie, S.; Toda, T.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K. Inhibitory effects of bifidobacterium-fermented soy milk on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine-induced rat mammary carcinogenesis, with a partial contribution of its component isoflavones. *Carcinogenesis* 2000, 21, 937–941.
- Park, B.-J., Haines, T., and Abu-Lail, N.I. 2009. A correlation between the virulence and the adhesion of *Listeria monocytogenes* to silicon nitride: an atomic force microscopy study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*; 73: 237–243.
- Patel, R. M., & Denning, P. W. (2013). Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence? *Clinics in perinatology*, 40(1), 11-25.
- Patel, R. M., & Denning, P. W. (2013). Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: What is the current evidence? *Clinics in Perinatology*, 40(1), 11–25.
- Patterson, J. A., & Burkholder, K. M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry science*, 82(4), 627-631.
- Patterson, J. A., & Burkholder, K. M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry science*, 82(4), 627-631.
- Pelling A. E., F. S. Veraitch, C. P. Chu, C. Mason and M. A. Horton. 2009. Cell Motility Cytoskeleton; 66: 409–422.
- Pogoryelov, D. 2005. The c15 ring of the *Spirulina platensis* F-ATP synthase: F1/F0 symmetry mismatch is not obligatory. *EMBO*; 6: 1040–1044.
- Polyakov P., C. Soussen, J. Duan, J. F. Duval, D. Brie and G. Francius. 2011. *PLoS One*: 6:18887.
- Rastall R. A. 2004. Bacteria in the gut; friends and foes and how to alter the balance. *Journal Nutritional*; 134:2022S-2026S.
- Reddy BS, Hamid R, Rao CV, 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.
- Rettger, L. F., and H. A. Cheplin. 1921. *A Treatise on the Transformation of the Intestinal Flora, with Special Reference to the Implantation of Bacillus acidophilus*. Yale University Press, New Haven, CT.
- Robert Barrons, PharmD, BCPS; and Dan Tassone, PharmD. 2008. Use of Lactobacillus Probiotics for Bacterial Genitourinary Infections in Women: A Review. Wingate University School of Pharmacy, Wingate, North Carolina; and Inova Fairfax Campus, Virginia Commonwealth University School of Pharmacy, Falls Church, Virginia
- Rolfe, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 130:396S–402S.
- Rotsch C. and M. Radmacher. 2000. *Biophysical Journal*; 78: 520–535.
- Rotsch C., K. Jacobson and M. Radmacher. 1999. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 96: 921–926.
- Rowland I, 2008. Probiotics and cancer – from in vitro to human studies. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 3: 165-168.
- S. E. Cross, Y. Jin, J. Rao, and J. K. Gimzewski. 2007. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature*: 1-4.
- 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 y 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.J., M. Gueimonde y E. Isolauri. 2005. Probiotics that modify disease risk. *Journal of Nutrition* 135:1294-1298.
- Sato M, Nagayama K, Kataoka N, Sasaki M, and Hane K. 2000. Local mechanical properties measured by atomic force microscopy for cultured bovine endothelial cells exposed to shear stress. *Journal Biomechanic*; 33:127–135.
- Schrezenmeir, J., & de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 361s-364s.

- Seelert, H., Poetsch A., Dencher, N. A., Engel, A. & Muller, D. J. 2000. Proton powered turbine of a plant motor. *Nature*; 405: 418–419.
- Shahid M, Rajoka R, Zhao H, Lu Y, Lian Z, Li N, Hussain N, Shao D, Jin M, Li Q, Shi J. Anticancer potential against cervix cancer (HeLa) cell line of probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from human breast milk. *Food Funct.* 2018; 9:2705–15.
- Sharma, M., & Shukla, G. (2016). Metabiotics: One step ahead of probiotics; an insight into mechanisms involved in anticancerous effect in colorectal cancer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1940. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01940>.
- Shenderov, B. A. (2013). Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception. *Microbial ecology in Health and Disease*, 24(1), 20399.
- Sheng, X., Ting, Y.P., and Pehkonen, S.O., 2008. The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. *Journal Colloid Interface Science*; 321: 256–264.
- Singh J, Rivenson A, Tomita M, Shimamura S, Ishibashi N, Reddy BS, 1997. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 18: 833–841.
- Soa SSY, Wana MLY, El-Nezami H. Probiotics-mediated suppression of cancer. *Curr Opin Oncol.* 2017; 29:62–72.
- Sreefumar O., and Hosono A. (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.
- Stavric, S., and E. T. Kornegay. 1995. Microbial probiotics for pigs and poultry. Pages 205–231 in *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*. R. J. Wallace, and A. Chesson, ed. VCH, New York.
- Tannock G. W., Munro K., Harmsen H. J., Welling G. W., Smart J., and Gopal P. K. .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.

- Tiptiri-Kourpeti, A., Spyridopoulou, K., Santarmaki, V., Aindelis, G., Tompoulidou, E., Lamprianidou, E. E., et al. (2016). Lactobacillus casei exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinoma cells. *PLoS One*, 11(2), e0147960 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147960>.
- Tortonese M. Cantilevers and tips for atomic force microscopy. 1997. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*;16:28–33.
- Trache, A., Meiningner, G.A., 2008. Atomic force microscopy (AFM). *Curr. Protoc. Microbiol.* Chapter 2, Unit 2 C.2.
- Trickey W. R., Vail T. P., and Guilak F. 2004. The role of the cytoskeleton in the viscoelastic properties of human articular chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research*; 22:131–139.
- Tsilingiri, K., & Rescigno, M. (2013). Postbiotics: what else?. *Beneficial microbes*, 4(1), 101-107.
- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., & Viale, G. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: Comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut*, 61, 1007–1015.
- Vadillo-Rodriguez, V., Beveridge, T.J., and Dutcher, J.R. 2008. Surface viscoelasticity of individual Gram-negative bacterial cells measured using atomic force microscopy. *Journal of Bacteriology*; 190: 4225–4232.
- Vaiyapuri M, Namasivayam N. Effect of ginger on bacterial enzymes in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *European Journal of Cancer Prevention*. 2006; 15(5):377-83.
- Viani, M. B. 2000. Probing protein–protein interactions in real time. *Nature Structural & Molecular Biology*; 7:644–647.
- Vieira, A. T., Fukumori, C., & Ferreira, C. M. (2016). New insights into therapeutic strategies for gut microbiota modulation in inflammatory diseases. *Clinical and Translational Immunology*, 5, e86. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.38>.
- Vogel V. and M. Sheetz. 2006. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; 7: 265–275.
- Volle, C.B., Ferguson, M.A., Aidala, K.E., Spain, E.M., Núñez, M.E., 2008. Quantitative changes in the elasticity and adhesive properties of Escherichia coli ZK1056 prey cells during predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109. *Journal Langmuir*; 24: 8102–8110.

- Willett W. C. 2001. Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiology Biomarkers Preventive*; 10:3-8.
- Williams, N. T. (2010). Probiotics. Adverse effects and safety. *American Journal of HealthSystem Pharmacy*, 66(6), 449–458.
- Wirtz D., K. Konstantopoulos and P. C. Searson. 2011. *Nature Reviews Cancer*; 11:512–522.
- Y. Fujita. 2009. *Nature Cell Biology*; 11:460–467.
- Yao, J. C., Shah, M. H., Ito, T., Bohas, C. L., Wolin, E. M., Van Cutsem, E., & Tomassetti, P. (2011). Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *New England Journal of Medicine*, 364(6), 514-523.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., ... & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782-2858.
- Zile M. R., Richardson K., and Cowles M. K. 1998. Constitutive properties of adult mammalian cardiac muscle cells. *Circulation*; 98:567–579.

12.2 LIBROS

- Brock, T. D., & Martinko, J. M. (1998). *Brock biología de los microorganismos* (No. 576 B7Y 1997).
- 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.
- García-Garibay M. 1996. Leches fermentadas como vehículos de probióticos.
- Johnson, K.L. 1992. *Contact mechanics*, Cambridge University Press, Cambridge, U.K., Pp.111-114.
- 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.

- Mateos JA. Bacterias y salud. Jornadas de Alimentos Funcionales (2002). Centre Innovació. Fundació Bosch i Gimpera. Universidad de Barcelona.
- Prescott, L.M., J.P. Harley y D.A. Klein. 2005. Microbiology (6th ed). McGraw-Hill, Boston.
- Puertollano E., Puertollano MA, Cruz Chamorro L., Alvarez de Cienfuegos G. y de Pablo MA. 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.
- 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.
- Walker, R. and M. Buckley. 2006. Probiotic microbes: the scientific bases. A report from the American Academy of Microbiology. ASM Press. Washington.
- Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL, 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. American Journal.

12.3 CAPÍTULOS DE LIBROS

- Armed Forces, 1975. Institute of Pathology. Manuel of Histologic and special staining technics. Washington, D.C. p. 1-36.
- Bäckhed F, et al. Cell Host & Microbe 2012;12(5):611-622.
- 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.
- Cruz, P. K. 2007. Inmovilización celular por atrapamiento, como vehículo de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bajo condiciones gastrointestinales humanas in vitro. UPIBI-IPN, México.

- 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.
- Figueroa I., L. Gómez-Ruiz, M. García y A. Cruz-Guerrero. 2006. El beneficio de los probióticos. Industria Alimentaria. 22-27.
- García-Garibay M. 1996. Leches fermentadas como vehículos de probióticos.
- Hampl JS, DiSilvestro RA (ed.). Perspectives in nutrition. 6.^a edition. Nueva
- Hertzler S. 1996. Probiotics and prebiotics and human health. En: Wardlaw GM,
- Johnson, K.L. 1992. Contact mechanics, Cambridge University Press, Cambridge, U.K., Pp: 111-114.
- 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.
- Mateos JA. Bacterias y salud. Jornadas de Alimentos Funcionales (2002). Centre Innovació. 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.
- Prescott, L.M., J.P. Harley y D.A. Klein. 2005. Microbiology (6th ed). McGraw-Hill, Boston.
- Puertollano E., Puertollano MA, Cruz Chamorro L., Alvarez de Cienfuegos G. y de Pablo MA. 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.
- 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.

- Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL, 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. American Journal.
- York. McGraw Hill; pp. 98-100.

12.4 TESIS

- 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.
- García Cobos, Alejandra 2011. Actividad biológica de los liofilizados del postbióticos con *Bifidobacterium longum* y con *Lactobacillus casei* sobre *Salmonella* spp. *Serratia marcescens* y *Enterobacter cloacae*. Tesis de Licenciatura, FCB/UANL-2011.
- 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.
- Zamora Herrera F.G., Morales Vallarta M., Barrón González M.P., (2007). Efecto del liofilizado del postbióticos 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.
- Durán-Páramo, E. 1997. Etude du comportement physiologique de *Bacillus subtilis* ATCC-21556 confiné et en suspension: suivi des métabolites et d'activités enzymatiques endo et exocellulaires. Tesis de doctorado. Université de Technologie de Compiègne, Francia.

12.5 MATERIAL ELECTRÓNICO

- Elia Khezr Jñápika Gurú y Pablo Elias Gómez Posse., IMPORTANCIA TERAPÉUTICA DE LAS BIFIDOBACTERIAS
[<http://jnanayoga3.tripod.com/sa/bifidobacterias.htm>]
- Euzéby, J.P. 2006. List of prokaryotic names withstanding 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>
- <http://critika-dietetika.blogspot.com/2012/09/histologia-del-intestino-delgado.html>
- INEGI, 2011,
www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/.../estadisticas/.../cancer0.do...
- International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP). 2009. Prebiotics: A consumer guide for making smart choices.
http://www.isapp.net/docs/Consumer_Guidelines-prebiotic.pdf.
- NMX-F-017-SCFI-2011. <http://200.77.231.100/work/normas/nmx/2010/NMX-F-017-SCFI-2011.pdf>
- NMX-F-068-S-1980. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-068-S-1980.PDF>
- NMX-F-089-1978. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-089-S-1978.PDF>
- NMX-F-608-NORMEX-2011
http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5360486&fecha=18/09/2014
- NOM-062-ZOO-1999.
<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
- NOM-086-SSAI-1994. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/086ssa14.html>
- OMS, 2008. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Patel KP, Patel VJ, 2010. Probiotics, prebiotics and synbiotics. Disponible en:
[<http://www.nhlmmcgym.com/indian-journal15.htm>]
- Prebiotics, 2010.
[http://170.107.206.70/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/pre_0326.shtml]
- The absolute importance of probiotics, 2009.
[http://www.vitamintrader.com/articles/2006_12_probiotics.html]

ANEXOS

1 ANEXO – NMX-F-068-S-1980.

ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS. FOODS.
DETERMINATION OF PROTEINS. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN
GENERAL DE NORMAS.

PREFACIO

En la elaboración de esta Norma participaron las siguientes Instituciones:
Subsecretaría de Salubridad.
Dirección General de Laboratorios de Salud Pública.

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma Mexicana establece el procedimiento para determinar proteínas en productos alimenticios.

2. REFERENCIA

Esta Norma se complementa con la siguiente Norma Mexicana vigente:

NMX-BB-014. Utensilios de vidrio usados en laboratorio - Clasificación y tamaños nominales. (Clasificación y tamaños nominales para utensilios de vidrio usados en el laboratorio).

3. FUNDAMENTO

Este método se basa en la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico. El hidrógeno y el carbón de la materia orgánica se oxidan para formar agua y bióxido de carbono. El ácido sulfúrico se transforma en SO₂, el cual reduce el material nitrogenado a sulfato de amonio.

El amoniaco se libera después de la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una disolución al 2% de ácido bórico. Se titula el nitrógeno amoniacal con una disolución valorada de ácido, cuya normalidad depende de la cantidad de nitrógeno que contenga la muestra. En este método de Kjeldahl-Gunning se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de sodio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión.

4. MATERIALES Y REACTIVOS

4.1 Materiales

- El equipo de vidrio empleado debe cumplir con los requisitos que establece la NMX-BB-014.
- Matraces Kjeldahl de 500 y/o 800 cm³
- Material común de laboratorio

4.2 Reactivos

Los reactivos que se mencionan a continuación, deben ser grado analítico, cuando se indique

ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS. FOODS.

agua, debe entenderse agua destilada.

- Ácido sulfúrico concentrado
- Sulfato de cobre pentahidratado
- Zinc granulado
- Hidróxido de sodio: Disolver con 500 cm³ de agua 500 g de hidróxido de sodio.
- Sulfato de sodio anhidro
- Ácido bórico al 2%
- Solución de ácido clorhídrico 0.1 N
- Indicador Shiro Tashiro: Disolver 0.2 g de rojo de metilo en 60 cm³ de alcohol y aforar a 100 cm³ con agua. Disolver 0.2 g de azul de metileno y aforarlos a 100 cm³ con agua. Mezclar 2 partes de rojo de metilo y una de azul de metileno.

5. APARATOS E INSTRUMENTOS

- Digestor y destilador Kjeldahl
- Balanza analítica con ± 0.1 mg de sensibilidad

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Determinar la masa, en la balanza analítica, de aproximadamente un gramo de muestra y pasarla cuantitativamente a un matraz Kjeldahl, añadirle 2 g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de sodio anhidro, 25 cm³ de ácido sulfúrico y unas perlas de vidrio.

6.2 Colocar el matraz en el digestor y calentar cuidadosamente a baja temperatura hasta que todo el material esté carbonizado, aumentar gradualmente la temperatura hasta que la disolución esté completamente clara y dejar por 30 minutos más a esa temperatura.

6.3 Enfriar y añadir de 400 a 450 cm³ de agua para disolver completamente la muestra, agregar 3 ó 4 gránulos de zinc, un poco de parafina cuando sea necesario y 50 cm³ de hidróxido de sodio 1:1.

6.4 Inmediatamente conectar el matraz a un sistema de destilación, el cual previamente se le ha colocado en la salida del refrigerante un matraz Erlenmeyer de 500 cm³ que contenga 50 cm³ de ácido bórico y unas gotas del reactivo Shiro Tashiro como indicador.

6.5 Destilar hasta que haya pasado todo el amoniaco, que unas gotas de destilado no den alcalinidad con el papel tornasol, aproximadamente 300 cm³

NOTA: Las primeras gotas de destilado deben hacer virar el color del indicador de violeta a verde.

6.6 Retirar el matraz receptor y titular el destilado con ácido clorhídrico 0.1 N.

7. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El Nitrógeno presente en la muestra, expresado en por ciento se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$V \times N \times 0.014 \times 100$$

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{V \times N \times 0.014 \times 100}{m}$$

En donde:

V = Volumen de ácido clorhídrico empleado en la titulación, en cm³

N = Normalidad del ácido clorhídrico.

m = Masa de la muestra en g.

0.014 = Miliequivalente del nitrógeno.

El por ciento de proteínas se obtiene multiplicando el por ciento de nitrógeno obtenido por el factor correspondiente (Véase A.2).

APÉNDICE A

A.1 El contenido de nitrógeno en diferentes proteínas es aproximadamente de 16% por lo que multiplicando el por ciento de nitrógeno obtenido por el factor 6.25 se obtiene la cantidad de proteínas presentes en el alimento. Sin embargo, en algunos productos, la relación nitrógeno-proteínas varía en forma trascendente por lo que es necesario utilizar los factores que en ese caso se señalen:

5.7 Pan y trigo

5.95 Arroz

6.31 Germen de trigo

6.25 Maíz

6.71 Soya

5.70 Cereales y pastas

6.38 Leche

8. BIBLIOGRAFÍA

- NMZ-Z-013 Guía para la redacción, estructuración y presentación de las Normas Mexicanas.
- Técnicas para el análisis fisicoquímico de alimentos. Dirección General de Investigación en Salud Pública. Secretaría de Salubridad y Asistencia 1976.
- Fecha de aprobación y publicación: agosto 4, 1980. Esta Norma cancela a la: NMZ-F068-1977.

2 ANEXO– NMZ-F-089-S-1978.

DETERMINACIÓN DE EXTRACTO ETÉREO (MÉTODO SOXHLET) EN ALIMENTOS.
FOODSTUFF-DETERMINATION OF ETHER EXTRACT (SOXHLET). NORMAS MEXICANAS.
DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

PREFACIO

En la elaboración de esta Norma participaron los siguientes Organismos:
Cámara de Productos Alimenticios Elaborados con Leche.
Productos Pesqueros Mexicanos.
Empacadora Brener, S.A.
Diconsa.
Secretaría de Salubridad y Asistencia
Dirección General de Control de Alimentos, Bebidas y Medicamentos
Laboratorio Nacional de Salubridad
Instituto Nacional del Consumidor.
Laboratorio Central de la Secretaría de Hacienda y Crédito Público.
Elías Pando, S.A.

AVISO AL PÚBLICO

Con fundamento en lo dispuesto en los Artículos 1º, 2º, 4º, 23, inciso C y 26 de la Ley General de Normas y de Pesas y Medidas, publicada en Diario Oficial de la Federación con fecha 7 de abril de 1961, esta Secretaría ha aprobado la siguiente Norma Oficial Mexicana "DETERMINACIÓN DE EXTRACTO ETÉREO (MÉTODO SOXHLET) EN ALIMENTOS" NOM-F-89-S-1978.

0. INTRODUCCIÓN

El método Soxhlet utiliza un sistema de extracción cíclica de los componentes solubles en éter que se encuentran en el alimento.

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma Mexicana establece el procedimiento para la determinación de ácidos grasos (extracto etéreo) por el método de Soxhlet en todos los alimentos sólidos, excepto los productos lácteos.

2. REACTIVOS Y MATERIALES

- Eter etílico anhidro (véase A.1.1).
- Material común de laboratorio.

3. APARATOS E INSTRUMENTOS

- Extractor Soxhlet.
- Cartucho de extracción de tamaño adecuado para el extractor (véase A.1.2)
- Parrilla eléctrica de placa con termostato.
- Estufa (100 – 110°C) con termostato y termómetro.
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg.

4. PROCEDIMIENTO

Transferir 2.0 g de muestra finamente dividida en el cartucho o dedal; cubrir con una porción de algodón. Colocar el cartucho dentro del extractor Soxhlet. En la parte inferior ajustar un matraz con cuerpos de ebullición (llevados previamente a peso constante por calentamiento a 100 – 110°C).

Colocar el refrigerante. Añadir éter por el extremo superior del refrigerante en cantidad suficiente para tener 2 ó 3 descargas del extractor (alrededor de 80 ml).

Hacer circular el agua por el refrigerante y calentar hasta que se obtenga una frecuencia de unas 2 gotas por segundo. Efectuar la extracción durante 4 a 6 horas. Suspender el calentamiento, quitar el extractor del matraz y dejar caer una gota de éter del extractor a un papel o vidrio de reloj, si al evaporarse el éter se observa una mancha de grasa, ajustar el Soxhlet de nuevo al matraz y continuar la extracción.

Evaporar suavemente el éter del matraz y secar a 100°C hasta peso constante.

5. CÁLCULOS

$$P - p / M \times 100$$

Porcentaje de Extracto Etéreo =

Donde:

- P = Masa en gramos del matraz con grasa.
- p = Masa en gramos del matraz sin grasa.
- M = Masa en gramos de la muestra.

APÉNDICE A

A.1 Observaciones

A.1.1 Precaución:

El éter es extremadamente inflamable. Se pueden formar peróxidos inestables cuando se almacenan mucho tiempo o se expone a la luz del sol.

Puede reaccionar con explosión cuando está en contacto con el óxido de cloro, litio o con agentes fuertemente oxidantes. Por ello es recomendable el empleo de extractores efectivos de vapores y evitar la electricidad estática.

A.1.2 Se puede emplear papel filtro en lugar del cartucho de extracción.

6. REPORTE DE PRUEBA

En el reporte de esta determinación se debe indicar el tiempo de extracción.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Técnicas para el análisis fisicoquímico de alimentos de la Dirección General de Investigación en Salud Pública y de la Dirección General de Control de Alimentos, Bebidas y medicamentos de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.
- Fecha de aprobación y publicación: noviembre 03, 1978. Esta Norma cancela a la: NMX-F-089-1964

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Carlos Daniel Gastaldi Elizondo

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Tesis: **Obtención y caracterización de posbióticos de *Lactobacillus sp.* / *Bifidobacterium longum* y su evaluación sobre carcinoma murino**

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Licenciado en Biotecnología Genómica en el año 2017.