



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**SELECCIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS TOLERANTES A  
DOXORRUBICINA, METOTREXATO Y PACLITAXEL**

***TESIS***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**JOSÉ MANUEL RUÍZ AMELCO**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor:** María de los ángeles Valdivia López

**VOCAL:**                 **Profesor:** Aurora Irma Ortega Ávila

**SECRETARIO:**       **Profesor:** Amelia María de Guadalupe Farrés Gonzales Saravia

**1er. SUPLENTE:**      **Profesor:** Gloria Díaz Ruiz

**2° SUPLENTE:**       **Profesor:** Francisco Ruiz Terán

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO 312. CONJUNTO E. DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA. FACULTAD DE QUÍMICA.  
UNAM

**ASESOR DEL TEMA:** Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés Gonzales Saravia

**(nombre y firma)**

**SUSTENTANTE (S):** José Manuel Ruíz Amelco

**(nombre) y firma)**

## Índice

Resumen .....	4
Capítulo I. Introducción.....	7
1.1 Justificación .....	9
Capítulo II. Objetivos.....	10
Capítulo III. Marco teórico.....	11
3.1 Cáncer .....	11
3.2 Cáncer de mama.....	13
3.2.1 Estructura de la mama sana .....	16
3.2.2 Sistema linfático de la mama .....	17
3.2.3 Signos y síntomas cáncer de mama.....	18
3.2.4 Protuberancias benignas de mama.....	18
3.2.5 Prevención y detección temprana en cáncer de mama.....	19
3.3 Tratamiento cáncer de mama.....	19
3.3.1 Terapia: local y sistemática .....	20
3.3.2 Quimioterapia .....	20
3.3.3 Fármacos de quimioterapia.....	22
3.3.4 Doxorrubicina .....	24
3.3.5 Metotrexato.....	26
3.3.6 Paclitaxel.....	28
3.4 Alimentos funcionales.....	29
3.5 Bacterias ácido lácticas.....	31
3.5.1 Características del género Lactobacillus .....	33
3.5.2 Metabolismo de carbohidratos en Lactobacillus.....	33
3.5.3 Importancia de los metabolitos producidos por los Lactobacillus.....	36
3.6 Probióticos.....	37
3.6.1 Directrices de probióticos.....	38
3.6.2 Microorganismos en el sistema gastrointestinal e inmunidad en humanos.....	39
3.6.3 Mecanismos de acción de los probióticos.....	40
3.6.4 El uso de probióticos como tratamiento para diarrea provocada en quimioterapia.....	41

3.6.5 Probióticos y modulación sistema inmune como respuesta al cáncer	43
3.6.6 Productos: dosis de probióticos para efecto benéfico en la salud.....	47
3.6.7 Planteamiento del problema .....	48
3.6.7.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011 .....	49
3.6.7.2 <i>Lactobacillus casei</i> R0215 .....	50
3.7 Medios de cultivo para bacterias ácido lácticas. Razones de elección...	50
3.7.1 Ventajas y desventajas de la leche Svelty para la elaboración del alimento funcional y el crecimiento de las BAL.....	50
3.7.2 Ventajas y desventajas de la bebida de amaranto para la elaboración del alimento funcional y el crecimiento de las BAL.....	51
Capítulo IV. ....	52
4.1 Materiales y reactivos. ....	52
4.2 Metodologías. ....	55
4.2.1 Metodología para determinar las cinéticas de desarrollo microbiano en distintos medios de crecimiento. ....	56
4.2.1.1 Preparación cultivo stock. ....	56
4.2.1.2 Preparación del inóculo (activación cultivo stock) .....	56
4.2.1.4 Preparación de los medios de fermentación.....	59
4.2.15 Fermentación .....	59
4.2.1.6 Cinética del desarrollo microbiano por plaqueo en agar MRS .....	59
4.2.1.7 Cinética del desarrollo microbiano por turbidimetría.....	61
4.3.1 Metodología de la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los fármacos antineoplásicos sobre las cepas BAL.....	62
4.3.1.1 La selección de colonias .....	63
4.3.1.2 Preparación y estandarización del inóculo.....	63
4.3.1.3 Inoculación de placas de agar MRS .....	63
4.3.1.4 Elaboración de pozos en placas de agar MRS .....	64
4.3.1.5 Adición de fármacos .....	64
4.3.1.6 Incubación .....	64
4.3.1.7 Medición de halos de inhibición e interpretación de resultados....	64
4.3.1.8 Preparación de las disoluciones de fármacos, concentraciones a probar. ....	65
4.3.1.8.1 Concentraciones de doxorrubicina.....	65
4.3.1.8.2 Concentraciones de metotrexato. ....	66

4.3.1.8.3 Concentraciones de paclitaxel.....	66
Capítulo V. Resultados y análisis de resultados.....	67
5.1 Determinación del tamaño del inóculo.....	67
5.2 Evaluación de crecimiento en diferentes medios de cultivo .....	69
5.2.1 Cinéticas de crecimiento .....	69
5.3.2 Determinación de desarrollo microbiano en diferentes medios por espectrofotometría.....	80
5.3.3 Aporte nutrimental de las bebidas fermentadas de amaranto y leche Svelty. ....	84
5.4 Resultados de pruebas de concentración mínima inhibitoria de antineoplásicos sobre <i>Lactobacillus rhamnosus R0011 150</i> y <i>Lactobacillus casei R0215</i> .....	88
5.4.1 Concentraciones plasmáticas estimadas de los antineoplásicos a evaluar.....	88
Capítulo VI. ....	103
6.1 Conclusiones.....	103
6.2 Perspectivas.....	105
Capítulo VII. ....	106
Bibliografía.....	106
Capítulo VIII. Apéndices .....	116
8.1 Tablas de resultados del crecimiento de <i>Lactobacillus casei R0215</i> en diferentes medios de cultivo.....	116
8.2 Tablas de resultados del crecimiento de <i>Lactobacillus rhamnosus R0011 150</i> en diferentes medios de cultivo.....	122
8.3 Concentraciones de fármacos en plasma sanguíneo y su fracción libre de éste .....	128

## Resumen

Los probióticos son microorganismos vivos que, una vez ingeridos en un número determinado, provocan un efecto benéfico en la salud. Entre ellos se encuentran bacterias ácido lácticas, bifidobacterias y levaduras. Algunas especies de lactobacilos han demostrado modular la inflamación en el tracto gastrointestinal y también se tienen estudios científicos que muestran la remisión de tumores en zonas distantes al sistema gastrointestinal, por efectos inmunomodulatorios, provocados por la administración de cepas probióticas (LeBlanc JG et al, 2002; de Moreno de LeBlanc A. et al., 2005).

El presente trabajo forma parte de una línea de investigación que pretende el desarrollo de alimentos funcionales para pacientes con cáncer de mama sometidas a quimioterapia. Tiene como finalidad evaluar la capacidad de crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en dos medios de cultivos que permitan su desarrollo, y evaluar la sensibilidad que estas cepas probióticas presentan con algunos fármacos de quimioterapia.

Para que los medios fermentados por estas cepas tengan el potencial de ejercer un efecto benéfico en la salud, deberán contener un número mínimo de microorganismo por mL del medio de cultivo de  $10^7$  UFC/mL. Los medios de cultivo seleccionados fueron medios comerciales: leche Svelty descremada en polvo y bebida de amaranto en polvo (Gastronomía Molecular S.A.).

Se comenzó la evaluación del desarrollo de las cepas probióticas con un tamaño de inóculo estandarizado de  $10^7$  UFC/mL con el fin de cumplir con el criterio de un alimento funcional, además de conocer la cantidad

inicial del microorganismo al inicio de las cinéticas de desarrollo. La estandarización del tamaño de inóculo se realizó elaborando una escala de McFarland. El tamaño de inóculo estandarizado se fijó a una densidad óptica de 0.411 a 600 nm, con el que se obtuvo para todas las cinéticas un tamaño de inóculo inicial de  $10^7$  UFC/mL.

El crecimiento de ambas cepas probióticas en los medios de fermentación seleccionados se logró satisfactoriamente. No hubo diferencia significativa en cuanto a las UFC/mL desarrolladas en caldo MRS y presentando un número de microorganismos en un rango de  $10^9$  a  $10^{10}$  UFC/mL, lo que permite denominar a estos productos fermentados como un "Producto con cultivos vivos y activos" según la National Yogurt Association (NYA).

Los medios fermentados con ambas cepas presentaron un decremento en su pH inicial que no provocó la precipitación de proteínas en el medio de amaranto pero sí en el de base láctea.

Para la evaluación de la tolerancia de las cepas probióticas a concentraciones fisiológicas de los antineoplásicos se realizó la prueba de determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de los fármacos hacia las cepas, Además se realizó una estimación teórica de la concentración de cada fármaco y su fracción libre en plasma sanguíneo, que es la que da el efecto terapéutico.

La MIC de doxorubicina para *Lactobacillus casei* R0215 fue de 1 mg/mL, mientras que para *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 fue de 4 mg/mL. Ambas concentraciones son aproximadamente 100,000 veces más altas que la concentración superior estimada que presenta la fracción libre del antineoplásico en sangre, cuando se aplica en monoterapia a concentraciones habituales.

La MIC de paclitaxel para *Lactobacillus casei* R0215 fue de 2.4 mg/mL y para *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 fue de 4.8 mg/mL. A ambas concentraciones resultaron ser 10 000 veces superiores a las concentraciones estimadas de la fracciones libres del fármaco en plasma sanguíneo.

La MIC de metotrexato para *Lactobacillus casei* R0215 fue de  $1.95 \times 10^{-3}$  mg/mL y para *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 fue de  $7.63 \times 10^{-6}$  mg/mL. A simple vista se puede observar que *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 es mucho más sensible a metotrexato que *Lactobacillus casei* R0215. Ambas cepas ácido lácticas son susceptibles a las concentraciones estimadas de metotrexato libre en plasma de  $5.123 \times 10^{-4}$  a  $2.762 \times 10^{-3}$  mg/mL.

Los resultados obtenidos ofrecen la posibilidad de utilizar ambos medios de cultivo evaluados como medios de crecimiento para la elaboración de la bebida fermentada.

Las cepas probióticas presentan una buena tolerancia hacia doxorubicina y paclitaxel, por lo cual las cepas bien pueden ser empleadas como agentes paliativos y/o agentes coadyuvantes durante régimen de quimioterapia de estos fármacos, en monoterapia a dosificaciones habituales. Sin embargo las cepas resultaron ser muy susceptibles a metotrexato a concentraciones fisiológicas estimadas de este fármaco, por lo cual la eficiencia de las bebidas fermentadas con estos microorganismos muy probablemente sea baja y con ello el efecto coadyuvante no se observe.

## **Capítulo I. Introducción**

### **Cáncer**

Es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento celular descontrolado y su esparcimiento en el cuerpo. Si el esparcimiento no es detenido, puede resultar en la muerte. El cáncer es provocado por factores externos (tabaco, químicos, radiaciones, y organismos infecciosos) y factores internos (mutaciones, hormonas, condiciones inmunes y mutaciones que ocurren en nuestro metabolismo). Estos factores pueden actuar conjunta o separadamente para iniciar o promover la transformación cancerosa la que, si no se detecta oportunamente y se trata, puede provocar la muerte en un lapso corto. Además que a nivel mundial es la segunda causa de mortalidad.

El desarrollo anormal de células puede tratarse por métodos quirúrgicos, por radioterapia o por agentes químicos, lo que se conoce como quimioterapia. Ésta utiliza diferentes fármacos en monoterapia o en combinación de dos o más, dentro de los cuales encontramos doxorubicina, metotrexato y paclitaxel. La quimioterapia puede ser agresiva y debilitar al organismo ya que, además de la destrucción de células cancerosas, ataca a un gran número de células sanas en proceso activo de reproducción. Algunos de los efectos secundarios de la quimioterapia son vómito, náuseas, inflamación en la mucosas y en algunas mujeres presentan neutropenia por disminución de células del sistema inmune. Para combatir estos síntomas, así como para reducir el debilitamiento y vulnerabilidad que esto conlleva, pueden ser útiles alimentos diseñados específicamente para tal efecto. En el mercado

existen bebidas altas en proteína, así como diversas bebidas fermentadas con cepas probióticas. Algunos médicos recomiendan evitar el consumo de leche en pacientes de cáncer, por poseer un alto contenido de grasas saturadas y por la posible presencia de hormonas que pudiesen promover el crecimiento celular en el caso del cáncer de mama, lo cual pudiera promover la proliferación de células cancerígenas, en el caso de tumores en los que se estimula su crecimiento a partir de hormonas.

Se debe destacar que algunas cepas del género *Lactobacillus* han contribuido a la remisión de tumores en modelos murinos (roedores), y se conoce el hecho de que varias cepas probióticas ayudan a prevenir diarreas infecciosas, a disminuir diarreas inducidas por la toxicidad de la quimioterapia (CID, por sus siglas en inglés) y a estimular el sistema inmune. Por lo tanto, la combinación de una buena base proteínica con probióticos que hayan demostrado efecto sobre tumores puede ser un producto de interés. El éxito de los productos que deben contener los organismos vivos requiere que éstos resistan la interacción simultánea con los fármacos administrados para el tratamiento de los fármacos administrados para el tratamiento. Por ello, el objetivo de este trabajo consiste en evaluar la capacidad de crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150, cepas probióticas comerciales en medios de cultivo formulados a base de proteínas lácteas o de proteínas vegetales. Evaluar la interacción simultánea entre las cepas y los fármacos a niveles fisiológicos. Se determinarán tamaños de inóculo, niveles de resistencia y se seleccionará el medio de cultivo idóneo para el desarrollo del alimento funcional.

## 1.1 Justificación

- La problemática de cáncer de mama a nivel global y nacional es de primordial consideración.
- Existen indicios de que cepas ácido lácticas por sí solas pueden ejercer efectos antitumorales, o de que empleadas en un vehículo fermentado, pueden presentar propiedades adyuvantes o paliativas, pudiéndose utilizar durante el tratamiento de quimioterapia en cáncer de mama.
- Los medios de crecimiento leche Svelty y una bebida comercial de amaranto, deben ser evaluados para el crecimiento de las cepas probióticas *Lactobacillus casei* R0215 o *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150, debido a que los lactobacillus son descritos como bacterias fastidiosas en cuanto a requerimientos nutrimentales así como de condiciones específicas de desarrollo.
- No existen productos específicos en el mercado que coadyuven al tratamiento de quimioterapia y permitan paliar efectos secundarios del tratamiento
- El efecto benéfico de las cepas probióticas solo se ejercerá si éstas soportan concentraciones fisiológicas de los fármacos.
- Existe una creciente aceptación de alimentos funcionales en los últimos años.

## Capítulo II. Objetivos

### 2.1 Objetivos generales

- Evaluar la capacidad de crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 en caldo MRS, leche Svelty en polvo y bebida de amaranto.
- Evaluar el nivel de resistencia de *Lactobacillus casei* R0215 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 a concentraciones fisiológicas del antineoplásicos comunes (doxorrubicina, metotrexato, paclitaxel) empleados en quimioterapia de cáncer de mama.

### 2.2 Objetivos particulares

- Se determinarán tamaños de inóculo apropiados para que los medios de cultivo fermentados tengan denominación de alimento funcional.
- Estandarizar el tamaño de inóculo inicial (UFC/mL) en las cinéticas de crecimiento de las cepas *Lactobacillus casei* R0215 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en los medios de cultivo: caldo MRS, leche descremada Svelty y bebida de amaranto.
- Se determinará el medio de cultivo óptimo para el desarrollo de la bebida fermentada.
- Encontrar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de doxorrubicina, metotrexato y paclitaxel de las cepas *Lactobacillus casei* R0215 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150.
- Se determinará si es viable el uso de *Lactobacillus casei* R0215 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en regímenes de monoterapia de doxorrubicina, metotrexato y paclitaxel, utilizados comúnmente en quimioterapia de cáncer de mama.

## Capítulo III. Marco teórico

### 3.1 Cáncer

El cáncer no es una enfermedad, sino un grupo de ellas que tiene en común la pérdida del control sobre la división celular, la diferenciación y, por consiguiente, su diseminación por el organismo, con una alta tasa de mortalidad. Los factores que lo desatan pueden ser externos (tabaco, químicos, radiaciones, y organismos infecciosos) o factores internos (mutaciones, hormonas, condiciones inmunes y mutaciones que ocurren en el metabolismo), los cuales pueden actuar en forma conjunta o individual, sin conocerse con precisión el elemento detonador de la transformación celular en cada caso. El desarrollo de la enfermedad requiere de múltiples pasos que pueden ocurrir en períodos cortos o a través de varios años. La detección se da cuando las células se convierten en células cancerosas o neoplásicas. Si se hace en estadios tempranos, es cuando la enfermedad es más tratable.

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo después de las enfermedades cardíacas, con 7.424 millones de defunciones ocurridas en 2008. Causa más muertes que el sida, tuberculosis y malaria en conjunto. Cuando los países son agrupados de acuerdo a su desarrollo económico y según la OMS, los países desarrollados tienen como primer lugar al cáncer como principal causa de muerte y segundo lugar en los países subdesarrollados.

En países desarrollados los tipos de cáncer diagnosticados más frecuentemente son de próstata, de pulmón y de bronquios entre hombres a nivel mundial. En el caso de las mujeres, son el cáncer de mama, colon y pulmón. En países en vías de desarrollo los tipos de cáncer de mayor incidencia son los de pulmón, estómago e hígado para hombre, y cáncer de mama, cervicouterino y de pulmón entre las

mujeres. Los tres tipos de cáncer que se diagnostican con mayor frecuencia, tanto en países desarrollados como en los que están en vía de desarrollo, son también los que más muertes causan.

Tabla 1. Principales causas de muerte a nivel mundial, en países desarrollados y en países en vías de desarrollo, en 2004 (AMERICAN CANCER SOCIETY).

Enfermedades	A nivel mundial			Países en vías de desarrollo			Países desarrollados		
	Posición	Muertes	%	Posición	muertes	%	Posición	muertes	%
<b>Enfermedades cardíacas</b>	1	8,923	15.1	1	7,342	14.5	2	1,563	19.3
<b>Neoplasias malignas</b>	2	7,424	12.6	2	5,255	10.4	1	2,154	26.6
<b>Enfermedades cerebrovasculares</b>	3	5,712	9.7	3	4,949	9.8	3	757	9.4
<b>Infecciones en las vías respiratorias inferiores</b>	4	4,177	7.1	4	3,910	7.7	4	305	3.8
<b>Condiciones prenatales</b>	5	3,180	5.4	5	3,141	6.2		35	0.4
<b>enfermedad pulmonar obstructiva crónica</b>	6	3,025	5.1	6	2,737	5.4	5	285	3.5
<b>Enfermedades diarreicas</b>	7	2,163	3.7	7	2,148	4.2		14	0.2
<b>HIV/SIDA</b>	8	2,040	3.5	8	2,018	4.0		20	0.2
<b>Tuberculosis</b>	9	1,464	2.5	9	1,448	2.9		15	0.2
<b>Accidentes automovilísticos</b>	10	1,275	2.2	10	1,158	2.3		114	1.4
<b>Diabetes mellitus</b>	11	1,141	1.9		914	1.8	7	221	2.7
<b>Malaria</b>	12	889	1.5		888	1.8		0	0.0
<b>Suicidios</b>	13	844	1.4		707	1.4	9	118	1.5
<b>Cirrosis</b>	14	722	1.3		655	1.3	10	116	1.4
<b>Nefritis y nefrosis</b>	15	739	1.3		611	1.2	8	126	1.6
<b>Todas las causas</b>		58,772	100		50,582			8,095	100

### 3.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama es el crecimiento anormal y desordenado de células del epitelio de los conductos o lobulillos mamarios y que tiene la capacidad de diseminarse (National Institute of Cáncer, 2009). El cáncer de mama en 2008 fue el quinto tipo de cáncer que cobró mayor número de vidas a nivel global. Provoca cada año cerca de 1.38 millones de nuevos casos nivel mundial diagnosticados, y presentó una mortalidad de 458 000 muertes a nivel mundial en 2008.

Tabla 2. Tipos de cáncer con mayor número muertes a nivel mundial en 2008 (Fuente: OMS Nota descriptiva No, 297: Cáncer. Enero 2013.)

Tipo cáncer	Número de muertes
<b>Pulmón</b>	1.37 millones
<b>Estomago</b>	736 000 muertes
<b>Hígado</b>	695 000 muertes
<b>Colon</b>	608 000 muertes
<b>Mama</b>	458 000 muertes
<b>Cervicouterino</b>	275 000 muertes

El cáncer de mama a nivel mundial es el tipo de cáncer con mayor número de nuevos casos detectados a nivel mundial al igual que la principal causa de muerte en mujeres con cáncer en un rango de edades de 25 a 55 años a nivel mundial (Globocan ,2008).

El cáncer de seno suele ser diagnosticado en etapas ya avanzadas de la enfermedad, sin embargo si se diagnostica pronto, se cura en un alto porcentaje. Por lo cual es esencial realizarte una autoexploración.

Octubre es el mes a nivel internacional dedicado al cáncer de seno, por eso un gran número de empresas y personas se han unido para luchar de distintas formas y crear conciencia sobre esta agresiva enfermedad.

En México, el cáncer de mama se convirtió en el año 2006 en la segunda causa de muerte en mujeres de 30 a 54 años de edad (INEGI). En el año 2008 se reportó una incidencia de 13,939 casos y una mortalidad de 5,217 (Globocan ,2008). En el año de 2009, fue de 15.41 por cada cien mil habitantes mayores a 14 años y la mayor incidencia ocurrió en el estado de Coahuila, con 17.88 por cada cien mil habitantes, y la menor, en Chiapas con 1.15 por cada cien mil habitantes. El Distrito Federal ocupó el segundo lugar con 17.27 por cada cien mil habitantes. Por grupos de edad, la mayor incidencia es de 60 a 64 años con 32.87, seguido del grupo de 50 a 59 años de edad, con 26.99 (CENAVECE, 2005).

El aumento de la enfermedad en los países en vías de desarrollo no ha sido paralelo a su detección y tratamiento, ya que no se dispone de suficientes recursos humanos y materiales, aunque se ha visto un esfuerzo por parte del gobierno, e incluso de las instituciones privadas, para la detección y prevención de esta enfermedad.

En contraste con los países en desarrollo, donde un 60% de los casos se detectan en estadios tempranos, en nuestro país, la mayoría se detectan en fases avanzadas, cuando la probabilidad de sobrevivencia a 5 años con tratamiento es menos de 30%, convirtiéndose en una de las enfermedades más costosas e impacto en todos los ámbitos.

En los países en vías de desarrollo surgen programas con el propósito de aumentar la detección temprana del cáncer de mama, entre ellos los "Lineamientos para la Promoción de la Salud y el Control del Cáncer de la Mama", promovidos por la Iniciativa Global de Salud de la Mama (BHGI por sus siglas en inglés), alianza en la que participan instituciones académicas, sociedades profesionales, organismos multilaterales, organizaciones filantrópicas y empresas farmacéuticas, consistiendo en

un esfuerzo integral, teniendo como fin, impactar en la supervivencia y calidad de vida de la mujer.

En México, dentro de los esfuerzos de la Secretaría de Salud y otras instituciones, sobresale el incremento de la cobertura de la mamografía en mujeres de 40 a 69 años de edad y de la incorporación del cáncer de mama al grupo de enfermedades cuyo tratamiento puede financiarse con el Fondo de Protección contra Gastos Catastróficos del Seguro Popular de Salud, beneficio a las mujeres de más bajos recursos.

Nuestro país ha iniciado ya estrategias para sensibilizar a la población de la importancia de la detección temprana del cáncer de mama, aumento la información a través de los medios de comunicación, reforzó la práctica de la autoexploración de la mama, organizó campañas de salud y mejoró el acceso a la atención clínica, y uno de los objetivos es impulsar la capacitación de los profesionales de la salud, acerca del abordaje integral del padecimiento (IMSS, 2011).

### 3.2.1 Estructura de la mama sana

El pecho femenino está constituido de muchos lóbulos (glándulas productoras de leche), de ductos (pequeños tubos que transportan leche de los lóbulos al pezón), tejido conectivo y tejido graso que rodea a los canales, lóbulos, venas sanguíneas y canales linfáticos.

El cáncer de mama generalmente comienza en células de ductos, algunos comienzan en células de lóbulos, mientras que otra cantidad pequeña en otras estructuras de la mama.

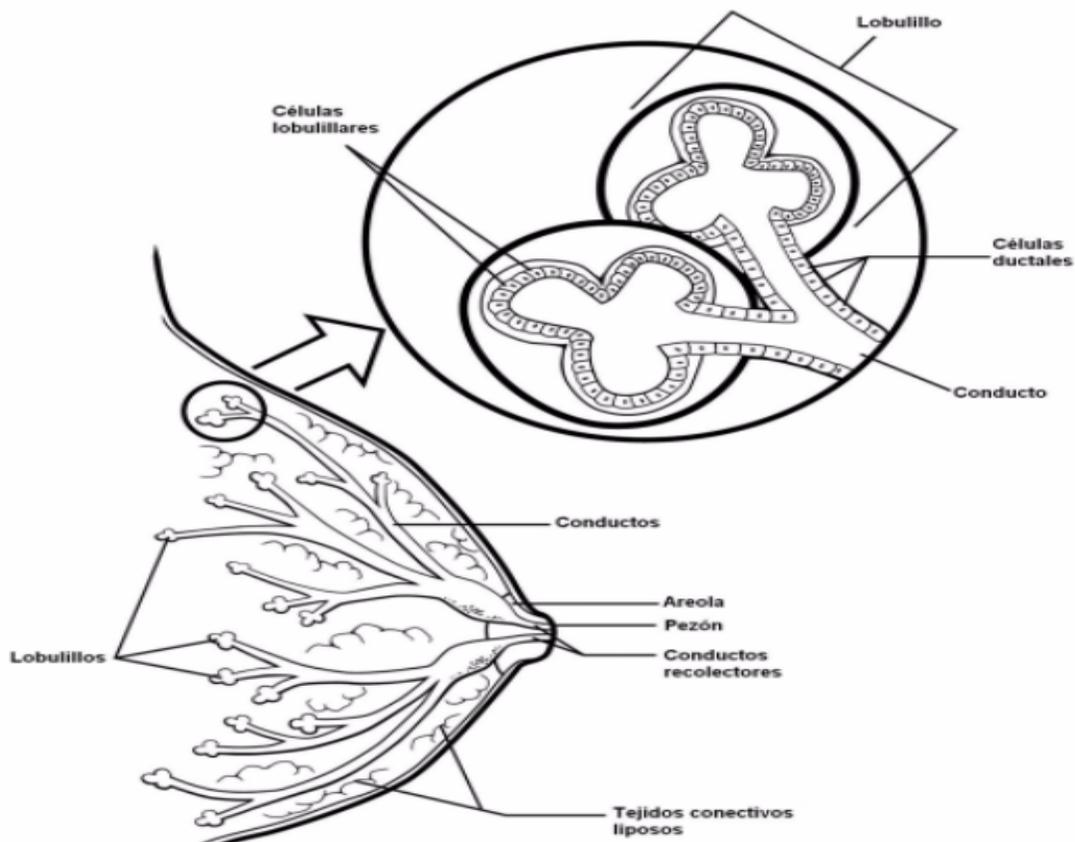


Fig. 1: Estructura de mama sana. Fuente: [www.cancer.org](http://www.cancer.org)

### 3.2.2 Sistema linfático de la mama

El sistema linfático en la mama es importante, ya que es una forma en la cual el cáncer se puede esparcir. Este sistema linfático está constituido de varias partes:

- Los nódulos linfáticos son estructuras pequeñas, cuya forma se asemeja a un frijol, y cuyo contenido son células inmunológicas.
- Los canales linfáticos son como pequeñas venas, que en vez de trasportar sangre, tienen un fluido transparente denominado linfa que es llevado fuera de la mama.
- La linfa contiene fluidos de desecho, así como células inmunológicas.

Las células cancerosas pueden infiltrarse a los canales linfáticos y comenzar a crecer en los nódulos linfáticos. Si las células malignas se han esparcido a los nódulos linfáticos, existe una alta probabilidad que terminen en el torrente sanguíneo y se distribuyan (metástasis) en otras partes del cuerpo. A mayor número de ganglios linfáticos que presenten cáncer, mayor es la probabilidad de encontrar estas células cancerosas en otras partes del cuerpo. No todas las células malignas encontradas en los nódulos linfáticos desarrollarán metástasis, por el contrario también se pueden presentar metástasis cuando no se hubieran encontrado células cancerosas en los nódulos linfáticos.

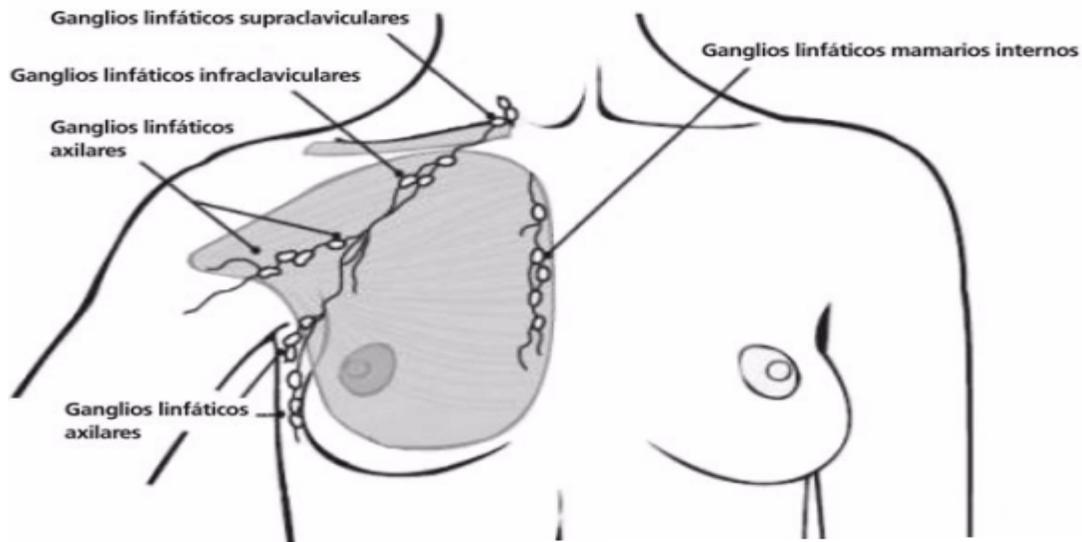


Fig. 2: Estructura mama sana. Fuente: [www.cancer.org](http://www.cancer.org)

### 3.2.3 Signos y síntomas cáncer de mama

La fase inicial del cáncer de mama generalmente no produce síntomas. Cuando el cáncer de mama ha crecido, puede ser detectado al tacto, la señal más común es una masa (bulto interno) que no presenta dolor. Otras señales son el endurecimiento, hendidura(s), erosión de piel, enrojecimiento o ardor, fluido desconocido, protuberancia, vena creciente, asimetría y piel de naranja. Todas las mujeres deben de familiarizarse con la apariencia y textura de sus mamas con el fin de una detección temprana y debido tratamiento. Con presentar uno de las señales mencionadas se debe acudir a revisión minuciosa y no esperar a presentar más de una de las características mencionadas.

### 3.2.4 Protuberancias benignas de mama

La mayoría de las protuberancias en la mama no son cancerosas. Aun así, se tienen que examinar para descartarlo. Es recomendable realizarse una revisión mínimo una vez al año con los estudios correspondientes, de acuerdo a la edad del paciente

### 3.2.5 Prevención y detección temprana en cáncer de mama

La mejor estrategia disponible para reducir la incidencia de padecer cáncer de mama es el reducir los factores de riesgo conocidos lo más posible: mantener un peso saludable, incrementar la actividad física, minimizar el consumo de alcohol.

Los métodos para la detección temprana de cáncer de mama incluyen escaneos por mamografía y examen clínico de la mama.

La mamografía es de gran valor para la detección temprana ya que puede detectar fases iniciales de la enfermedad, cuando es más tratable. Numerosos estudios han mostrado que la detección temprana salva vidas e incrementa las opciones de tratamiento. Desafortunadamente el costo de los escaneos con mamógrafos a una población de un país en vías de desarrollo puede ser incosteable. Sin embargo, es factible hacer examen clínico y auto exploración.

#### **Clasificación de los factores de riesgo: modificables y no modificables.**

Factores no modificables: ser mujer, tener más de 40 años, antecedente familiar, menarquía temprana o menopausia tardía.

Factores modificables: Obesidad, alto consumo de azúcares y grasas, alcohol, uso de anticonceptivos de manera indiscriminada y sin previa aprobación médica, no tener hijos y no amamantar.

### 3.3 Tratamiento cáncer de mama

Con base en el tamaño del tumor, la fase y otras características clínicas, además de la preferencia del paciente, el tratamiento puede ser una **lumpectomía** (remoción quirúrgica del tumor más 1 cm más de tejido sano) o **mastectomía** (remoción de la mama completa) con la

extracción de algunos ganglios linfáticos de bajo de la axila para obtener un mejor diagnóstico sobre el estado de desarrollo de la enfermedad; **radioterapia**; **terapia hormonal**; **quimioterapia**. Comúnmente se usan dos o más métodos.

### **3.3.1 Terapia: local y sistemática.**

La terapia local trata el tumor sin afectar el resto del cuerpo, la cirugía y la radiación son ejemplos de terapias locales.

La terapia sistemática se refiere a los fármacos que pueden ser administradas oralmente o directamente al sistema sanguíneo en busca de células cancerosas en cualquier parte del cuerpo, como son la quimioterapia y la terapia hormonal.

### **3.3.2 Quimioterapia**

La quimioterapia es un tratamiento que emplea fármacos que eliminan a las células cancerosas, administrados vía intravenosa o vía oral. El fármaco viaja en el torrente sanguíneo en busca de células malignas en la mayor parte del cuerpo. La quimioterapia es aplicada en varias sesiones, con espacios programados, frecuentemente después de 2 o 3 semanas entre cada una, con el fin de proveer un período de recuperación. Los tratamientos generalmente duran algunos meses. Varían según sea el fármaco, combinación de los mismos y del estadio de la enfermedad en cada paciente. En etapas avanzadas de cáncer de mama el tratamiento toma más tiempo, según el desempeño de los medicamentos. Generalmente la terapia adyuvante o neoadyuvante toma un periodo de 3 a 6 meses

Existen varias situaciones que recomiendan el uso de la quimioterapia:

**Después de la cirugía (quimioterapia como adyuvante):** cuando el paciente no presenta rastro de cáncer después de la cirugía, y se administra quimioterapia denominándose terapia adyuvante, cuyo objetivo es reducir el resurgimiento de la enfermedad por alguna célula. La radiación, la quimioterapia, y la terapia hormonal son usadas como tratamiento adyuvantes.

En etapas tempranas de la enfermedad, las células cancerosas pueden migrar del pecho, lugar donde se originó el tumor y alcanzar el torrente sanguíneo. Estas células no causan síntomas y no aparecen en las imágenes de las pruebas (mamografías), y no pueden ser detectadas en exámenes físicos. Si estas células se desarrollan, se pueden establecer y formar nuevos tumores en otras partes del cuerpo. El objetivo de la quimioterapia como adyuvante, es matar a las células que han migrado del seno.

**Quimioterapia antes de la cirugía (quimioterapia como tratamiento neoadyuvante):** Es denominada quimioterapia neoadyuvante. Frecuentemente esta terapia es la misma que la suministrada después de la cirugía. El mayor beneficio de aplicar antes los antineoplásicos es reducir el tamaño de tumores cancerosos y que así su remoción quirúrgica sea menos traumática pues se afecta una zona menos extensa. La otra ventaja de la quimioterapia neoadyuvante es ver la respuesta del tumor a los fármacos de la quimioterapia. Si el tamaño del tumor no se reduce con el primer fármaco, se sabrá que se necesita emplear otro.

**Quimioterapia para cáncer de mama avanzado:** Puede ser utilizada para aquellas mujeres en las que el cáncer se ha esparcido fuera de la mama y bajo del brazo (axila). La duración del tratamiento dependerá

de la disminución en tamaño del tumor, y de qué tanto las pacientes soporten el tratamiento.

### **3.3.3 Fármacos de quimioterapia**

En la mayoría de los casos (especialmente como adyuvante o neoadyuvante), la quimioterapia es más efectiva cuando se emplea más de una sustancia. Se usan muchas combinaciones de fármacos, no existe una combinación que sea la mejor, pues en cada caso se tiene diferentes: estadios de la enfermedad, edades y respuestas diferentes al tratamiento.

Algunas de las combinaciones de fármacos comúnmente empleadas son:

- CMF: Ciclofosfamida, metotrexato y 5-flourouracilo.
- CAF: Ciclofosfamida, doxorubicina (adriamicina) y 5-flourouracilo.
- AC: Doxorubicina (adriamicina) y ciclofosfamida.
- EC: Epirubicina y ciclofosfamida.
- TAC: Doxatrel (Taxotere), doxorubicina (adriamicina) y ciclofosfamida
- AC→T: Doxorubicina (adriamicina) y ciclofosfamida seguido de paclitaxel o doxatrel.
- AC→CMF: Doxorubicina (adriamicina), seguido de CMF.
- CEF: Ciclofosfamida, epirubicina y 5-flourouracilo.
- TC: Doxatrel (Taxotere) y ciclofosfamida.
- THC: Doxatrel, carboplatino y herceptin.

**([www.cancer.org](http://www.cancer.org)).**

### 3.3.3.1 Posibles efectos de la quimioterapia

- Pérdida de cabello
- Inflamación bucal
- Pérdida de apetito o aumento
- Náuseas o vómito
- Diarrea severa con estreñimiento severo
- Disminución de células sanguíneas(neutropenia)
- Afectación a células inmunológicas, lo cual puede ocasionar:
- Un aumento en la posibilidad de infecciones (por la disminución de células blancas)
- La facilidad de presenta moretones o hemorragias ( por la disfunción de plaquetas),
- Fatiga
- Algunas personas con cáncer desarrollan una aversión a las grasas
- Entre otros.

Estos efectos secundarios aparecen durante la administración de los fármacos de quimioterapia y desaparecen una vez que se detiene su administración. Tal como se ha descrito. Los fármacos se administran en varias sesiones espaciadas en el tiempo, por lo cual el tratamiento resulta largo, agresivo y agotador para las pacientes. Esto lleva al planteamiento de la utilización de un alimento funcional cuyo contenido proteico sea alto, animal o vegetal, que contenga probióticos de antecedentes conocidos que ayuden a paliar y reducir algunos de los efectos secundarios producidos por los fármacos de la quimioterapia durante la misma y no después, como tratamiento adyuvante. ([www.cancer.org](http://www.cancer.org)).

### 3.3.4 Doxorubicina

- **Denominación:** Doxorubicina (DCI), Acromicina, Hidroxildaunorrubicina.
- **Presentación:** Vial liofilizado: Polvo rojo-anaranjado 50 mg de Doxorubicina.
- **Almacenamiento:** Conservar a temperatura ambiente y protegido de la luz (Vial liofilizado).
- **Reconstitución:** con solución fisiológica (0.95% NaCl) o agua inyectable.
- **Estabilidad:** 48 h después de reconstituído, en refrigeración (2°-8°C).
- **Compatibilidad con envases y equipos:** Se adsorbe en cristal y polietileno. Compatibilidad con polipropileno, no se absorbe.
- **Dosificaciones:** habituales vía intravenosa en monoterapia, **15-75 mg/m<sup>2</sup>**
- **Farmacología:** Es un antibiótico antineoplásico del grupo de las antraciclinas, producido por *Streptomyces peucetius* (var. *caesius*). Se han propuesto múltiples mecanismos de acción: (a) se intercala entre las bases del ADN, produciendo cambios topológicos que resultan en la inhibición de la síntesis de ADN, y secundariamente de ARN y proteínas, (b) inhibidor de la topoisomerasa II, que resulta en roturas del ADN, (c) formación de radicales libres hidroxilos, que determinan las rupturas del ADN, efecto alquilante y peroxidación de lípidos celulares (toxicidad cardíaca), (d) unión a fosfolípidos y alteración de la fluidez de membranas celulares, que causan sobrerregulación del receptor del factor epidérmico de crecimiento e inhibición de la transferrina. Es activa durante todas las fases del ciclo celular, en especial en fase S.

- **Farmacocinética**

Distribución: se distribuye ampliamente en el organismo. Atraviesa la placenta, no atraviesa BHE. Unión a proteínas plasmáticas 79-85%. **Volumen de distribución 20-30 L/kg.**

Metabolismo: Es metabolizado en hígado y otros tejidos: metabolitos activos (doxorubicinol) e inactivos.

Eliminación: Eliminación hepatobiliar en heces (40-50%) y renal (5-12%, sólo el 1% aparece en orina después de 5 días).

### 3.3.5 Metotrexato

- **Denominación:** Metotrexato (DCI), ametofterina, alfa-methopterin, MTX, mexate.
- **Presentación:** Metotrexato vial 50 mg/2mL.
- **Almacenamiento:** Conservar a temperatura ambiente (<30° C) y protegido de la luz.
- **Reconstitución:** con solución fisiológica (0.95% NaCl) o agua inyectable.
- **Estabilidad:** 15 días en refrigeración, 7 días a temperatura ambiente y protegido de la luz.
- **Compatibilidad con envases y equipos:** No se han descrito incompatibilidades con PVC, vidrio, poliolefina o material de jeringas o equipos de administración intravenosa.
- **Dosificaciones:** habituales vía intravenosa en monoterapia: **40-80 mg/m<sup>2</sup>**, 2-4 veces/semana.
- **Farmacología:** Es un antimetabolito del ácido fólico. Actúa como falso sustrato en el proceso de síntesis (fase S del ciclo celular) de los constituyentes esenciales de los ácidos nucleicos, provoca la síntesis de un ADN anómalo o incluso la detención del proceso de síntesis de estos ácidos. Inhibe de forma competitiva la enzima dihidrofolatorreductasa por lo que se debe utilizar el ácido folínico como rescate de toxicidad.
- **Farmacocinética**  
Distribución: Se distribuye ampliamente en todos los tejidos alcanzando concentraciones elevadas en riñón, vesícula biliar, bazo, hígado y piel. Atraviesa la placenta pero no la barrera hematoencefálica, pero por intratecal pasa a circulación sistémica.  
**Vd: 0,4-0,9 L/Kg.** Unión a proteínas plasmáticas 50%.

Eliminación: Parte de la dosis es metabolizada intracelularmente y en el hígado y la mayor parte es eliminada por el riñón en forma inalterada. En pequeña proporción se excreta por heces, vía biliar:  
t 1/2: 8-15 h (dosis altas), 3-10 h (dosis bajas).

### 3.3.6 Paclitaxel

- **Denominación:** Paclitaxel (DCI), NSC-125973.
- **Presentación:** Taxol 30 mg. Vial de 5 mL con una concentración de 6 mg/mL.
- **Almacenamiento:** Temperatura ambiente y protegido de la luz.
- **Reconstitución:** con solución fisiológica (0.95% NaCl).
- **Estabilidad:** 27 h, después de ser reconstituído, a temperatura ambiente o refrigeración.
- **Compatibilidad con envases y equipos:** El paclitaxel es escasamente soluble y requiere una compleja formulación para su administración IV, la cual contiene Cremophor EL y etanol.  
No administrar en envases ni equipos que lleven PVC. El Cremophor es un surfactante que produce efectos hepatotóxicos cuando reacciona con compuestos de PVC.
- **Dosificaciones:** habituales vía intravenosa en monoterapia: **135-250 mg/ m<sup>2</sup>**
- **Farmacología:** Promueve la formación de microtúbulos celulares anómalos y estabiliza la estructura de éstos. Así, es capaz de inhibir la formación del huso mitótico durante la división celular, bloqueando el proceso de mitosis. Específico de fase (G2/M).
- **Farmacocinética**  
Distribución: Importante unión a proteínas plasmáticas (89-97%). Se distribuye ampliamente excepto en el LCR. **Vd: 42-162 L/m<sup>2</sup>**.  
Metabolismo: Hepático (90%).  
Eliminación: Biliar. t 1/2: 3-52 h.  
**(S.E.F.H, 2006).**

### **3.4 Alimentos funcionales**

El consumo de alimentos inocuos, libres de microorganismos patógenos o de sus toxinas, libres de microorganismos que puedan alterar su composición, ha surgido tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. De cualquier forma, estos alimentos no deben estar contaminados con sustancias indeseables o, al menos, deben de presentar concentraciones por debajo de los límites máximos permitidos para no representar un riesgo para la salud. Por otra parte, el interés de los consumidores por una dieta que les permita mantener un estado saludable y les ayude a prevenir enfermedades degenerativas, enfermedades crónicas como la diabetes, cáncer, hipertensión y otras, ha incrementado la demanda en el consumo de alimentos naturales y poco procesados. Desde 1980, estos y otros factores han conducido al estudio y desarrollo de alimentos funcionales. La necesidad sobre el desarrollo de estos productos crece día a día, debido al potencial de crecimiento de estos productos en el mercado por los beneficios que pueden proporcionar al bienestar de los consumidores (Hilliam, 2000).

El concepto de alimento funcional fue desarrollado durante los años ochenta en Japón y obtuvo un estatus legal en 1991, siendo descritos como FOSHU, o "Foods for Specified Health Use". Este país ha establecido un proceso regulatorio para la aprobación de los alimentos funcionales, como se conocen en Japón, no existen en toda Europa, o en Estados Unidos, ya que en estos países, no existe regulación legal y especificaciones de ellos (Stanton et al., 2001). En Brasil la legislación sobre los alimentos funcionales es reciente y la supervisa AVISA, National Agency of Sanitary Vigilance.

Los alimentos funcionales son definidos como alimentos que, además de proporcionar nutrimentos, proveen al organismo de componentes que

contribuyen a la cura de enfermedades, o reducen el riesgo de desarrollar una. Los alimentos funcionales son similares en apariencia a los alimentos convencionales consumidos en la dieta común, pero son capaces de producir metabolitos o efectos fisiológicos. De acuerdo al International Life Science Institute (ILSI), un alimento puede ser considerado funcional si se demuestra que tienen un efecto benéfico en el cuerpo.

Los alimentos funcionales pueden ser alimentos reconstituídos (restauración del contenido inicial de vitaminas y minerales), alimentos enriquecidos, alimentos dietéticos específicos a las necesidades de los consumidores, aunque el aspecto nutrimental no es el objetivo principal de este tipo de alimentos. De cualquier forma, deberán ser consumidos en cantidades balanceadas como si se tratase de un alimento convencional.

Un alimento funcional puede ser natural, adicionado de uno o varios componentes, o aquél en el que uno o más componentes se han eliminado por procesos tecnológicos o biotecnológicos.

Los productos fermentados pueden ser incluidos en la categoría de alimentos funcionales debido al contenido de calcio (que permite reducir osteoporosis, hipertensión y cáncer de colon) y otros componentes que mejoran la salud. En décadas recientes, ha aumentado el interés del efecto benéfico que pueden tener las leches fermentadas en la salud, resultando en un incremento en la variedad y cantidad de este tipo de productos alrededor del mundo. Los alimentos actuales se han usado tradicionalmente como vehículos para cepas de probióticos para consumo humano. Las bacterias ácido lácticas son un grupo importante de microorganismos usado en la fermentación de leche y muchas de estas bacterias son consideradas como probióticos.

Las leches fermentadas son el resultado del metabolismo de bacterias ácido lácticas que crecen en la leche. Su excelente calidad nutrimental esta atribuido a la leche, la cual frece una importante fuente de calcio, proteínas, fósforo y riboflavina. Los efectos benéficos para la salud son resultado de la fermentación, que aporta un número grande de microorganismos y de productos de fermentación. Los productos fermentados actuales contienen diversas bacterias que promueven el buen estado de salud, y constituyen un buen segmento del mercado de los alimentos funcionales (Batish y Grover, 2004). Representan un grupo con una tendencia de crecimiento dentro de los alimentos funcionales y de una intensa área de investigación en el desarrollo de productos de consumo diario con microorganismos probióticos en la época actual.

### **3.5 Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se emplean en la fermentación de alimentos como leche, carne y vegetales para obtener productos como el yogurt, quesos, encurtidos, embutidos, ensilados, etc. Además de contribuir en la biopreservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales, como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva. Algunas de ellas se consideran probióticos, que son cultivos puros, o mezcla de cultivos de microorganismo vivos, que al ser consumidos por el hombre y los animales en cantidades adecuadas mejoran la salud. La mayoría de los probióticos pertenecen a las BAL.

Las BAL son un grupo de microorganismos representadas por géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivo, no esporulados, móviles, anaeróbicos, microaerofilicos o aerotolerantes; oxidasa catalasa negativos, carecen de citocromo, no reducen el nitrato y producen ácido

láctico como único o producto mayoritario. Además, las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2. Otras a valores tan altos como 9.6, y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5 permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde las otras bacterias se verían inhibidas por la producción de ácidos orgánicos (Carr et al., 2002; Görner y Valík, 2004; Hutkins, 2006; Ramírez et al., 2011).

Las BAL están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos, tierra, plantas verdes, así como también del tracto digestivo y vagina de mamíferos, entre otras fuentes. Para su multiplicación requieren de azúcares como glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento. La leche es un medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL. Sin embargo, otros alimentos son también excelentes medios de crecimiento y producción de metabolitos de bacterias ácido lácticas, entre ellos se encuentran las masas de cereales, los vegetales y la carne. (Vásquez et al., 2009).

Los principales miembros de las BAL son los géneros de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*.

*Lactobacillus* es el género más grande de BAL, consiste en alrededor de 80 especies reconocidas (Stiles y Holzapfel, 1997; Konings et al., 2000; Hutkins, 2006; Reddy et al., 2008; Kocková y Valík, 2011).

### **3.5.1 Características del género Lactobacillus**

El género Lactobacillus está compuesto por bacilos Gram positivos, catalasa negativos, no esporulados, presentan diámetros de colonias entre 1.5  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ , presentan colonias finas, convexas y lisas. Sin embargo la morfología que presentan en placas de agar es variable, algunas cepas producen colonias largas y redondas y otras cepas producen colonias pequeñas o bien de tamaño irregular (Görner y Valík, 2004; Hutkins, 2006).

La mayoría de los Lactobacillus son mesófilos, aunque el género contiene algunas especies que son psicrófilos, termodúricos y termófilos. La temperatura óptima de crecimiento varía de 30 a 45°C. Algunas especies presentan alta tolerancia a la sal, a altas presiones osmóticas, y a una baja actividad acuosa. Son ácido tolerantes, capaces de crecer a un pH abajo de 4.4. El pH óptimo de crecimiento es de 5.5-6.5. Algunas cepas son resistentes a etanol, y resisten bien las sales biliares. La mayoría de las especies son aerotolerantes, pero algunas de ellas requieren condiciones estrictas de anaerobiosis (Hutkins, 2006; Reddy et al., 2008; Gereková et al., 2011).

### **3.5.2 Metabolismo de carbohidratos en Lactobacillus**

Los Lactobacillus son bacterias fermentativas. Dependiendo de la ruta metabólica de los azúcares, la fermentación es llamada homofermentativa o heterofermentativa. Algunas especies tienen la capacidad genética y fisiológica para fermentar azúcares por ambas rutas y, por lo cual se les llama bacterias heterofermentativas facultativas.

Los lactobacilos homofermentativos producen más del 85% de ácido láctico a partir de la glucosa. Las hexosas son metabolizadas por

enzimas de la vía enzimática de Embden Mayerhoff. Por esta ruta se fermenta un 1 mol de glucosa y se producen 2 moles de piruvato, generándose 2 moles de ATP por molécula de glucosa metabolizada. Después el piruvato es reducido a L o D-lactato por la enzima lactato deshidrogenasa. El ácido láctico es producido como producto mayoritario. (Hutkins, 2006; O´Toole y Lee, 2006; Gänzle et al., 2007; Reddy et al., 2008; Hudecová y Šimkovič, 2009).

Los lactobacilos heterofermentativos producen solo el 50% de ácido láctico a partir de glucosa. Convierten hexosas a pentosas, produciendo ácido láctico y otros productos como acetato, etanol y CO<sub>2</sub> (Carry et al, 2000). Además de su diversidad metabólica los lactobacilos son microorganismos fastidiosos en cuanto a los requerimientos nutrimentales para su crecimiento óptimo. Requieren carbohidratos como fuente de energía y demandan una fuente de nucleótidos, de aminoácidos y de vitaminas que contenga al grupo B para poder crecer de forma rápida (Arpai y Bartl, 1977; Marklinder y Lönner, 1992; Görner and Valík, 2004; Valík et al., 2008).

Tabla 3. Clasificación de lactobacilos en función de su ruta fermentativa (Gereková P. et al., 2011).

<b>Homofermentativos obligados</b>	<b>Heterofermentativos facultativos</b>	<b>Heterofermentativos obligados</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
<i>Lactobacillus farciminis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>		<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>		<i>Lactobacillus acidifarinae</i>
<i>Lactobacillus mindesis</i>		<i>Lactobacillus fructivorans</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>		<i>Lactobacillus frumenti</i>
		<i>Lactobacillus hilgardii</i>
		<i>Lactobacillus panis</i>
		<i>Lactobacillus pontis</i>
		<i>Lactobacillus rossiae</i>
		<i>Lactobacillus siliginis</i>
		<i>Lactobacillus spicheri</i>
		<i>Lactobacillus zymae</i>

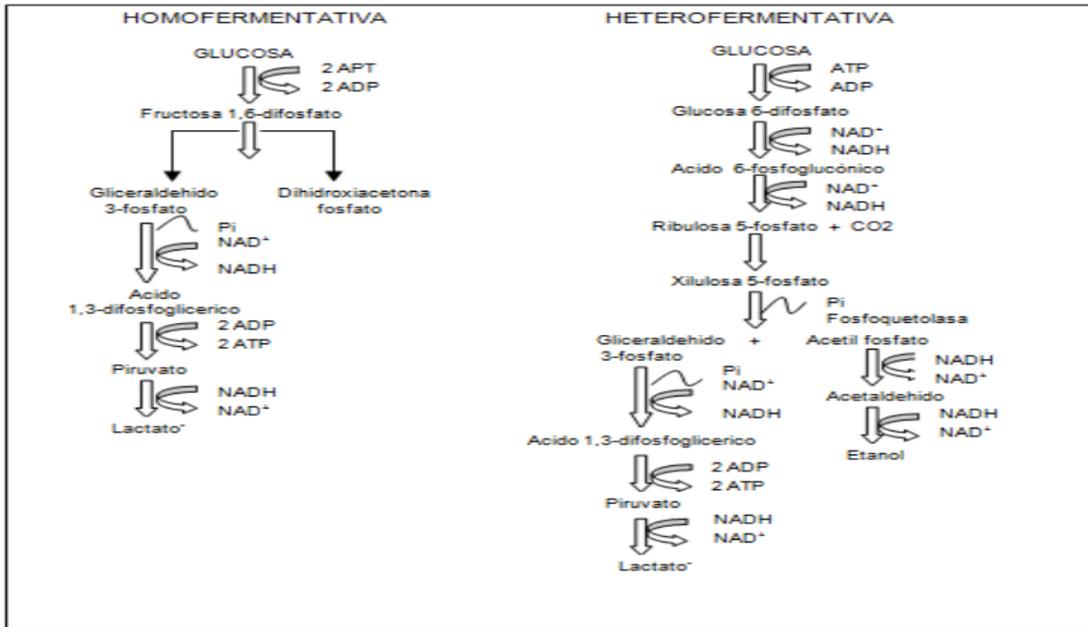


Fig. 3. Metabolismo fermentativo de bacterias ácido láctico (Gereková P. et al., 2011).

### 3.5.3 Importancia de los metabolitos producidos por los *Lactobacillus*

En la industria alimentaria algunas BAL heterofermentativas son más importantes que la homofermentativas, por ejemplo en la producción de compuestos que intensifican el sabor y aroma, como acetaldehído y diacetilo (García et al., 1998; Jay, 2000).

#### - **Ácido láctico y otros ácidos de cadena corta.**

Las bacterias ácido lácticas pueden ejercer un efecto antagónico sobre microorganismos patógenos, este efecto es el resultado de la disminución del pH por la producción de ácidos orgánicos, como ácido láctico y ácido acético, resultado del metabolismo de azúcares, (Lilley et al., 1965).

#### - **Peróxido de hidrogeno**

En presencia de oxígeno, las BAL producen peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ). En presencia de  $H_2O_2$ , el ion superóxido ( $O_2^-$ ) forma radicales hidroxilo ( $OH^-$ ), que causa peroxidación a los lípidos de la membrana y aumentan su permeabilidad. El resultado es un efecto bactericida, que incluye la destrucción de ácidos nucleicos y proteínas celulares en muchos microorganismos (Kong et al., 1980; Dahl et al., 1989).

#### - **Bacteriocinas**

Las bacteriocinas son estructuras de tipo péptido o proteína biológicamente activas, pues presentan acción bactericida sobre receptores específicos de las células; además, la composición química de estas sustancias es muy variada, así como su actividad, y pesos moleculares (Naidu S. et al., 2010).

### **3.6 Probióticos**

La palabra probiótico fue utilizada por primera vez en 1965 por Lilley y Stillwell para describir las sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otro. Fuller en 1989, enfatizó que es requisito indispensable de un probiótico su viabilidad, además de introducir la idea de tener un efecto benéfico en el huésped (Prado F. et al., 2007). Los probióticos son, microorganismos vivos que una vez ingeridos en un número determinado provocan un efecto benéfico en la salud ((FAO/WHO, 2001; Guarner et al., 1998).

Los probióticos más comúnmente empleados son especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, pero no exclusivamente (tabla 4).

**Tabla 4. Microorganismos empleados como probióticos  
(Prado F. et al, 2007).**

<i>Lactobacillus ssp</i>	Bifidobacterium spp	Otros
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Bf. adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Bf. Animalis</i>	<i>Clostridium botyricum</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Bf. Breve</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Bf. Bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Bf. infantis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>Bf. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis sp. cremoriss</i>
<i>Lb. bulgaricus</i>	<i>Bf. longum</i>	<i>Lactococcus lactis sp. lactis</i>
<i>Lb. fermentum</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides sp. dextranicum</i>
<i>Lb. gasseri</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lb. helveticus</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Lb. johnsonii</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lb. lactis</i>		<i>Streptococcus salivarius sp. thermophilus</i>
<i>Lb. paracasei</i>		
<i>Lb. plantarum y Lb. reuteri</i>		

### 3.6.1 Directrices de probióticos

Debido a la carencia legal del término “probiótico” el criterio mínimo que debe cubrir un producto con probióticos según la FAO, 2006 y la WHO, 2011 son los siguientes:

- Especificar en la etiqueta el género, especie y cepa de los microorganismos contenidos como probióticos. Se debe utilizar una nomenclatura consistente con nombres científicos reconocidos,
- Que resistan acidez y sales biliares del sistema gastrointestinal,
- Que los microorganismos se encuentren viables al final de su vida de anaquel,
- Que sea seguro bajo las condiciones recomendadas de uso,

- Condiciones óptimas de almacenamiento,
- Dosis recomendada, basada en la inducción del efecto fisiológico benéfico según la evidencia experimental.
- Información y contacto del productor.

### **3.6.2 Microorganismos en el sistema gastrointestinal e inmunidad en humanos**

La información disponible acerca de la composición microbiana intestinal, en estados saludables y de enfermedad es aun limitada. En el estómago y duodeno se encuentra un número bajo de microorganismos: menos de  $10^3$  UFC/g de contenido, principalmente lactobacilos y estreptococos. El ácido, las sales biliares y las secreciones pancreáticas eliminan a la mayoría de los microorganismos ingeridos; los movimientos intestinales de propulsión sobre la comida impiden una colonización eficiente de los microorganismos presentes en el lumen. En el yeyuno e íleon (partes del intestino delgado) el número de bacterias se incrementa progresivamente de  $10^4$  UFC/g en el yeyuno a  $10^7$  UFC/g de contenido en la zona distante del íleon. En el intestino grueso existe un gran número de anaerobios,  $10^{12}$  UFC/g de contenido.

El intestino presenta una microbiota de alrededor de 100 trillones de bacterias que proveen de 600,000 genes a cada humano. Están localizados principalmente en el intestino grueso y son cientos de especies de bacterias. La mayoría de las bacterias fecales no puede cultivarse debido a sus exigentes condiciones de crecimiento. La diversidad de especies y cepas entre individuos es alta y está determinada por el genotipo de individuo, por la colonización inicial al nacimiento y por transmisión vertical entre microorganismos.

La interacción normal entre las bacterias del tracto gastrointestinal y el huésped es de tipo simbiótica. La influencia de bacterias presentes en el

sistema gastrointestinal sobre la respuesta inmunológica se sugiere por la presencia de estructuras linfoides en la mucosa del intestino delgado (placas de Peyer), que poseen un epitelio especializado que atrapa antígenos del lumen y en su interior contienen centros germinales de linfocitos para inducir una respuesta inmunológica adaptativa.

El intestino es la parte del cuerpo más importante en cuanto a funciones inmunológicas, contiene aproximadamente el 60% de las células inmunológicas del cuerpo (WHO, 2011).

### **3.6.3 Mecanismos de acción de los probióticos**

Los probióticos afectan a la microbiota intestinal por el aumento en el número de microorganismos anaerobios benéficos y por la disminución de microorganismos potencialmente patógenos. Los probióticos afectan el ecosistema intestinal mediante la estimulación inmunológica o, de mecanismos no inmunológicos, con efectos antagónico y competitivo sobre microorganismo patogénicos.

#### **Mecanismos estimulatorios no inmunológicos**

- En el colon los microorganismos pueden proliferar mediante la fermentación de los sustratos disponibles de la dieta, lo cual representa competencia por nutrientes contra microorganismos patógenos.
- Alteran el pH local y crean un ambiente desfavorable para los patógenos.
- Producción de bacteriocinas que inhibe a patógenos.
- Producción de peróxido de hidrogeno y formación de radicales libres.
- Mejora la barrera intestinal y tienen la capacidad para la producción de mucina.

- Competencia por sitio de adhesión.
- Modificación de toxinas, por erradicación de patógenos.

### **Mecanismos estimulatorios del sistema inmunológico**

- Activación de macrófagos locales al incrementar la presentación de antígenos a linfocitos B e incremento en la producción de inmunoglobulinas IgA localmente y de forma sistemática.
- Modulación de citocinas.
- Inducen a una menor respuesta hacia antígenos presentes en los alimentos.

(Prado et al., 2007; WHO, 2011).

#### **3.6.4 El uso de probióticos como tratamiento para diarrea provocada en quimioterapia.**

La mucositis (inflamación de la membrana mucosa) es la mayor complicación gastrointestinal (GI) al recibir quimioterapia para cáncer. (Duncan M et al., 2003., Keefe DM, 2004). Debido a que la mucositis puede afectar cualquier parte del GI, los pacientes pueden presentar una diversidad de síntomas desde dolor abdominal, acidez estomacal, náuseas, inflamaciones, vómitos y diarrea. La diarrea inducida por la toxicidad de la quimioterapia (CID) es el síntoma más común relacionado a la toxicidad de la quimioterapia. Se estima que del 20% al 45% de todos los pacientes en quimioterapia experimentan diarrea severa durante su tratamiento. CID empeora muchísimo la calidad de vida de los pacientes, de tal forma que interrumpen el tratamiento, lo abandonan o necesitan mayor número de visitas y un mayor estadio en el hospital. CID generalmente está clasificado como una diarrea osmótica o diarrea secretoria. El componente osmótico se atribuye al agente citotóxico que provoca daño en el epitelio gastrointestinal, reduciendo la absorción de cloruro, causan expulsión de agua al lumen,

lo que resulta en diarrea. Además, la quimioterapia cambia la composición en la microbiota nativa, afecta al metabolismo de varias enzimas intestinales y la regulación de la angiogénesis y funciones inmunológicas (Miller, A et al., 2009). Otros factores asociados al aumento de la incidencia de CID son la edad avanzada, tener género femenino, presentar colitis y ser intolerante a la lactosa. La variación en las terapias puede incrementar la incidencia de CID.

Se tienen estudios donde se ha demostrado la utilidad de los probióticos para disminuir el CID en pacientes sometidos a quimioterapia:

Abd El-Atti et al., 2009, reportaron el caso de una paciente con cáncer de mama en estado de metástasis y CID por régimen de quimioterapia, a la que trataron con probióticos. Los primeros intentos de reducir el CID fueron mediante hidratación y tratamiento con loperamida (antidiarreico). Aunque la intensidad de la diarrea fue controlada al principio, el antidiarreico ocasionó a su vez un incremento en el dolor abdominal y mayor inflamación, lo que llevó a su discontinuación. Posteriormente la paciente fue tratada con una dosis de una combinación de 8 cepas de probióticos en un orden de 450 billones de UFC dos veces al día. Los probióticos controlaron los síntomas y redujeron su severidad casi al primer día tras su administración. No se observaron efectos adversos. También reportaron que si el paciente dejaba la administración de la mezcla de probióticos la diarrea aparecía inmediatamente.

Los probióticos pueden reducir CID por varios mecanismos. Siguiendo una administración oral, los probióticos pueden modular la composición de la microbiota y formar una barrera física de protección que interfiere con la adhesión de bacterias patógenas. La producción de ácido láctico crea un ambiente poco favorable para microorganismos patógenos

(Rasic, J. L. y Kurmann, J. A. 1983.). Sin embargo no existe una dosis clara recomendada de probióticos para el tratamiento de pacientes con CID.

### **3.6.5 Probióticos y modulación sistema inmune como respuesta al cáncer**

Los tratamientos convencionales para el cáncer de mama, usan drogas citotóxicas que tienen muchos efectos secundarios y empeoran la calidad de vida del paciente. Por lo cual hoy en día la farmacología busca de tratamientos con efectos secundarios mínimos y una eficiencia máxima. La inmunoterapia es una rama muy interesante que estudia la inducción de señales del sistema inmune para tener un resultado deseado. En el intestino, los lactobacilos y otros probióticos son responsables de la regulación del epitelio gastrointestinal mediante distintos mecanismos. Uno de ellos es la activación y proliferación de células inmunológicas por efecto de la producción de citocinas, que además regulan mecanismos inflamatorios (Wallace TD et al., 2003).

Entre algunos de los efectos inducidos por la administración de probióticos sobre el sistema inmunológico encontramos:

- La administración de probióticos provoca la proliferación de linfocitos que es el primer indicio de la activación del sistema inmune por la presencia de antígenos (Easo J et al., 2002; Maroof H. et al., 2012).
- Takagi et al., 2001 demostraron que la administración de *Lactobacillus casei Shirota* (LcS) en ratones, es capaz de retrasar la aparición de tumores inducidos así como la reducción en la incidencia de aparición. Ellos observaron que este efecto estaba

relacionado con el aumento de la actividad de células natural killer (NK).

- Los lactobacilos son capaces de inducir la producción de interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) en modelos in vivo e in vitro (Chuang L et al., 2007).
- Las células natural killer son la mayor fuente de IFN- $\gamma$ , estudios han demostrado que *L. acidophilus* es capaz de aumentar la producción de IFN $\gamma$  que tiene una capacidad anticancerígena, reguladora de angiogénesis y el aumento en la actividad de las células N (Maroof H. et al., 2012).

Las células dendríticas (glóbulos blancos) son células del sistema inmunológico, capaces de fagocitar patógenos, pero su principal función es la de procesar material antigénico, devolverlo a su superficie y presentarlo a células especializadas del sistema inmunológico. Los componentes de la pared celular de *Lactobacillus* ssp. y otros probióticos, como el peptidoglucano y otros ácidos lipoteicoicos, inducen la maduración y activación de células dendríticas por la vía de receptores tipo Toll 2 (TR2) (Maassen C, 2000, Chuang L et al., 2007).

- Yasdi et al., 2001 estudiaron que *L. acidophilus* es capaz de incrementar los niveles de citocina IL-2 en linfocitos del vaso (esplenocitos) cultivados. Murosaki et al., 2000, encontraron que el consumo diario de lactobacilos tiene un efecto antitumoral al presentar incrementos en IL-2 en etapas avanzadas del desarrollo del tumor cuando la producción de IL-2 es reducida.

- TGF- $\beta$  es una citocina producida por los linfocitos Th2 con propiedades antiinflamatorias que a su vez induce la producción de la citocina IL-10 en macrófagos asociados al tumor (TAM: macrófagos que se encuentran dentro y alrededor de los tumores). Esta citocina inclina a los linfocitos Th2 a presentar patrones micro ambientales tumorales (Maeda H. et al., 1996). TGF- $\beta$  es producido por las células tumorales y actúa sobre las células inmunológicas indiferenciadas, células epiteliales y células del músculo liso causando inmunosupresión y angiogénesis (Massagué J. 2008). TGF- $\beta$  es la llave para incrementar la tolerancia inmunológica, y los tumores producen altos niveles de esta citocina para protegerse de la constante vigilancia del sistema inmune la cual involucra la inhibición de la proliferación de células T encargadas de reconocer los antígenos (Maeda H. et al., 1996). *L. acidophilus* es capaz de disminuir la producción de TGF- $\beta$  en cultivos de esplenocitos (Maroof H. et al., 2012).
- De Moreno de LeBlanc A. et al., 2005 observaron que la administración prolongada de yogurt a ratones provocaba la reducción en la actividad de B-glucoronidasa y nitroreductasa, enzimas altamente activas y presentes en cáncer de colon.

El intestino es el primer sitio donde se pueden hacer pruebas con probióticos administrados oralmente en el hospedero. De cualquier forma es importante considerar que el hospedero presenta un sistema inmunitario de mucosas, que le asegura que todas las membranas mucosas estén recubiertas con una amplia variedad de secreciones que contienen anticuerpos. Las células B y T pueden migrar desde las placas de Peyer en el íleon, a las mucosas respiratorias, mucosas gastrointestinales, a tractos genitales como también a glándulas

lagrimales, glándulas salivales y prostáticas (Brandtzaeg P. et al., 2004). Entre algunas de las evidencias del efecto inmunomodulatorio de probióticos en zonas distantes al sistema gastrointestinal encontramos:

- La administración oral de leche fermentada con *L. helveticus* R389 incrementa el número de células secretoras de IgA en el intestino delgado así como en bronquios de ratones. Las fracciones peptídicas producidas durante la fermentación de la leche con *L. helveticus* R389 han sido reportadas como estimulantes de sistema inmune al igual que inhiben el desarrollo de fibrosarcoma en modelos roedores, sugiriendo la importancia que tiene la bacteria así como los productos elaborados durante la fermentación de la leche (LeBlanc JG et al., 2002).
- La mayor influencia inmune en cáncer de mama está asociada a células inmunes infiltradas al tumor, las cuales producen numerosos mensajeros biológicos, como citocinas asociadas a la respuesta antitumoral (Reed MJ y Purohit A., 1997.)
- De Moreno de LeBlanc A. et al., 2005, observaron decrementos en la concentración de citocina IL-6 en sangre y en células de glándulas mamarias por la administración de productos fermentados en un modelo murino. Este fenómeno no sucedió en el grupo control, que presentó incrementos en citocina IL-6. Esta citocina está involucrada con la síntesis de estrógeno relacionado con la proliferación de cáncer de mama. También encontraron un incremento de IL-10 en plasma sanguíneo como en células de glándulas mamarias en aquellos grupos de ratones a los que se les administró bebidas fermentadas y se retrasó o

detuvo el crecimiento anormal; de igual forma este incremento de citocina no se observó en el grupo control. Los autores sugieren una posible regulación de IL-6 (por su disminución) a causa del aumento de IL-10 en los grupos de donde el desarrollo del tumor se detuvo. Se sabe que IL-10 es liberada por células inmunológicas infiltradas al tumor como macrófagos y linfocitos. Otra citocina que se incrementó con la administración de los fermentados fue TNF- $\alpha$  la cual se sabe que induce la apoptosis celular.

Por la evidencia presentada anteriormente, la administración de productos fermentados puede modificar la microbiota intestinal, estimular las células inmunes asociadas al intestino y regular la respuesta inmune de forma útil contra la inflamación intestinal, contra cáncer de colon e incluso en patologías de tejidos distantes como el cáncer de mama.

### **3.6.6 Productos: dosis de probióticos para efecto benéfico en la salud**

Las formas más comunes de productos con probióticos son productos de consumo diario y alimentos fortificados con probióticos (bebidas lácteas fermentadas) aunque, existen presentaciones en tabletas, cápsulas, o sobres que contienen la bacteria liofilizada como las proporcionadas por el Instituto Rosell (WHO, 2011; PROFECO, 2004).

La dosis requerida de probióticos es muy variable, dependerá de la cepa y del producto. Aunque no se conocen las dosis efectivas de cada una de las cepas en particular, se sabe que deben ser consumidas en grandes cantidades para que tengan efecto en el huésped (González F. et al., 2006). "La asociación de leches fermentadas y bebidas con bacterias ácido lácticas", con sede en Japón propone una concentración

mínima de  $10^7$  UFC/mL de producto para que se generen los efectos benéficos a la salud de los consumidores. Otras agrupaciones, como la estadounidense National Yogurt Association (NYA) exigen un mínimo de  $10^8$  UFC/g en el momento de la producción para poder ser calificado el producto como “Producto con cultivos vivos y activos” (Lourens-Hattingh, A. et al., 2001).

### **3.6.7 Planteamiento del problema**

Se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica para localizar cepas que se hubiesen empleado con fines de reducción de tumores. Se entró en contacto con investigadores y proveedores, lamentablemente, la cepa para la que existen referencias directas sobre su efecto en cáncer de mama en modelo murino no está disponible, ya que fue patentada en Canadá (De Moreno de LeBlanc et al., 2005). Esta cepa, *Lactobacillus helveticus* R389, mostró efecto antitumoral sobre células con cáncer de mama. Se hicieron intentos infructuosos de contacto con la Dra. Chantal Matar de la Universidad de Moncton en Ottawa-Canadá.

Se optó por trabajar con cepas de la empresa alemana Lallemand, quien a través de su centro de investigación, Institut Rosell, nos donó las cepas *Lactobacillus casei* R0215 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150.

### 3.6.7.1 *Lactobacillus rhamnosus* R0011 (Rossell-11, Institut Rosell's probiotic strains)

*Lactobacillus rhamnosus* es un huésped natural del intestino y la microbiota vaginal. Debido a que *Lactobacillus rhamnosus* es microaerófilo, puede colonizar la parte final del intestino delgado y el colon. La especie de *Lactobacillus rhamnosus* es uno de los probióticos más estudiados en el mundo, y ha demostrado tener efectos benéficos.

*Lactobacillus rhamnosus* R0011 fue aislado de productos de consumo diario. Es resistente a la acidez gastrointestinal, el 100% de la población sobrevive después de ser expuesta a un pH 4, el 15% del tamaño inicial de inóculo sobrevive al ser expuesto a pH 3 y también es capaz de crecer bien en presencia de sales biliares. Además, esta cepa es capaz de adherirse bien a células de la laringe y del epitelio intestinal in vitro. Se recomienda su consumo

Para mantener un balance en la microbiota intestinal; por su capacidad de adherirse a *E. coli*, la cual causa diarrea. Se ha demostrado en pruebas clínicas, que el consumo de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 y *Lactobacillus acidophilus* R0052 tiene un efecto benéfico en casos de intolerancia a lactosa, en diarrea provocada por diversos orígenes y en la reducción del meteorismo. Además, se ha demostrado en estudios *in vitro* su capacidad para estimular el sistema inmunológico, pues regula tanto la proliferación de células como la de citocinas, las que disminuyen si están relacionadas con la inflamación (Institut Rosell's probiotic strains, 2002).

**3.6.7.2 *Lactobacillus casei* R0215** (Rossell-215, Institut Rosell's probiotic strains).

Las cepas de *Lactobacillus casei* se encuentran generalmente en vegetales, leches y carnes fermentadas, así como en la boca e intestino humano.

El efecto benéfico demostrado para la especie está asociado con la prevención y tratamiento de diarrea, con la capacidad de alterar la microbiota intestinal y estimulación al sistema inmunológico.

*Lactobacillus casei* R0215 es muy resistente a la acidez, sobreviviendo el 95% del inóculo inicial después de estar expuesto a un pH 4. Después de ser expuestas a pH 3 por 30 min, un porcentaje del 60% de la población bacteriana es capaz de crecer bien en presencia de sales biliares (Institut Rosell's probiotic strains, 2002).

### **3.7 Medios de cultivo para bacterias ácido lácticas. Razones de elección**

#### **3.7.1 Ventajas y desventajas de la leche Svelty para la elaboración del alimento funcional y el crecimiento de las BAL**

La leche es un medio rico, ya que cumple con los requerimientos nutrimentales establecidos (fuente de carbohidratos, vitaminas y minerales) que garantizará el crecimiento de las bacterias ácido láctico. Su desventaja principal es la eliminación de lácteos en la dieta del paciente con cáncer por recomendación frecuente del oncólogo, cuya base científica no está del todo clara, aunque un argumento es la posible presencia de hormonas. Por tanto, optar por la base láctea podría disminuir la posibilidad de consumo por parte de las pacientes que han recibido esta recomendación.

### **3.7.2 Ventajas y desventajas de la bebida de amaranto para la elaboración del alimento funcional y el crecimiento de las BAL**

La denominada bebida de amaranto producida por Gastronomía Molecular S. A., constituye una alternativa interesante a la leche, pues aporta nutrimentos similares, indispensables para el crecimiento de las cepas. Resulta ser más interesante que la soya, pues en ésta existen evidencias de fitohormonas, que en ciertos tipos de tumor ejercerían acción similar a la de los estrógenos y progesterona, que pueden coadyuvar al desarrollo del tumor.

## Capítulo IV.

### 4.1 Materiales y reactivos.

#### Reactivos

- Agua destilada
- EDTA (0.2%, pH 12)
- Ácido sulfúrico 1 %
- Glicerol
- Cloruro de bario 1%
- Hidróxido sodio 10M
- Cloruro de sodio 0.85% y 0.95%

#### Medios de cultivo

- Agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe)
- Bebida nutritiva de amaranto en polvo "naturalmente alegría" de gastronomía molecular
- Caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe)
- Leche Svelty descremada en polvo

#### Fármacos

- Doxorrubicina: Nombre comercial "Doxolem", marca TEVA, lote: JF081A, caducidad nov 2014.  
Doxorrubicina reconstituida con solución de cloruro de sodio (0.9%).  
concentraciones, por dilución seriada con factor de dos:  
concentración inicial 8 mg/mL a una concentración final de  $1.22 \times 10^{-4}$  mg doxorrubicina/ mL solución
- Metotrexato: Nombre comercial "Trixiem", marca TEVA, lote: JF013B, caducidad: OCT 2015.  
Metotrexato reconstituído con solución de cloruro de sodio (0.9%)  
concentraciones, por dilución seriada con factor de dos:  
concentración inicial de 1mg/mL a una concentración final de  $4.77 \times 10^{-7}$  mg metotrexato/mL de solución.

- Paclitaxel: Nombre comercial "Praxael", marca TEVA, lote: CF106A, caducidad: SEP. 2013.

Paclitaxel reconstituído con solución de cloruro de sodio (0.9%) concentraciones, por dilución seriada con factor de dos: concentración inicial de 4.8mg/mL a una concentración final de  $9 \times 10^{-3}$  mg metotrexato/mL de solución y una concentración de 6 mg/mL.

## Equipos y material

- Agitador magnético
- Algodón
- Asa bacteriológica
- Autoclave Yamato SM300
- Balanza analítica Voyager
- Balanza granataria Adamson
- Espectro UV-Vis Biomate
- Espátula
- Estufa Gravity E-71 37°C
- Gasa (manta de cielo)
- Hisopos de madera
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL y 500 mL
- Micropipetas de 100 y 1000  $\mu$ L
- Papel aluminio
- Parrilla eléctrica
- Penicilindros de 1 cm altura y 7 mm diámetro
- Pinzas de disección
- Pipetas serológicas graduadas de 1 mL
- Bureta graduada de 25 mL
- Cajas Petri estériles desechables 90 x 15 mm
- Campana de flujo laminar
- Celdas de plástico
- Piseta
- Potenciómetro
- Probetas (10, 50, 150 y 500 mL)
- Propipetas
- Puntas de polipropileno de 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L
- Tubos eppendorf 2 mL
- Tubos de ensayo con tapón de rosca
- Tubos Falcon de 15 y 50 mL
- Vidrio de reloj
- Vaso de precipitados(50, 100, 250 y 500 mL)
- Vórtex

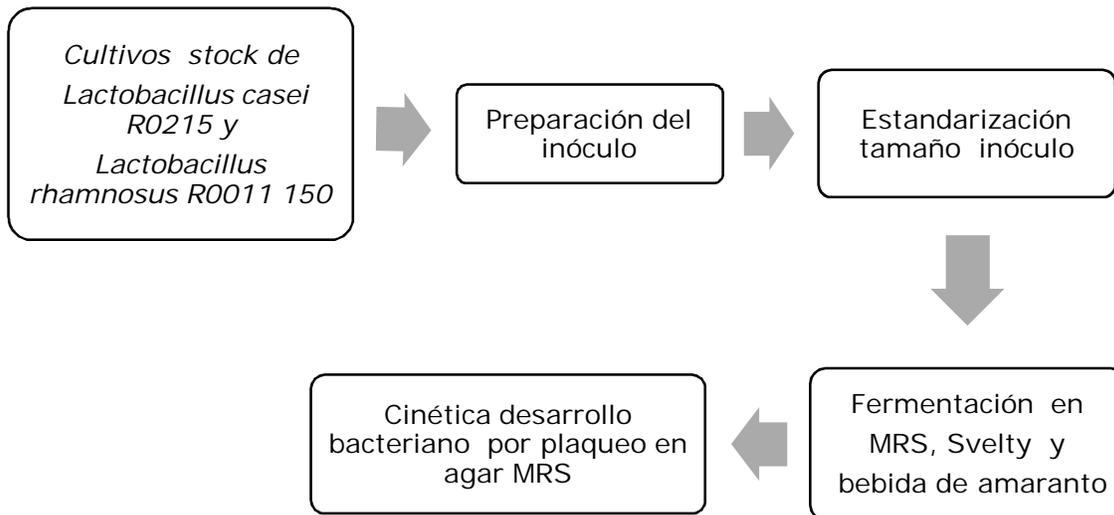
## Cepas

Liofilizados puros de cepas comerciales "Lallemand"

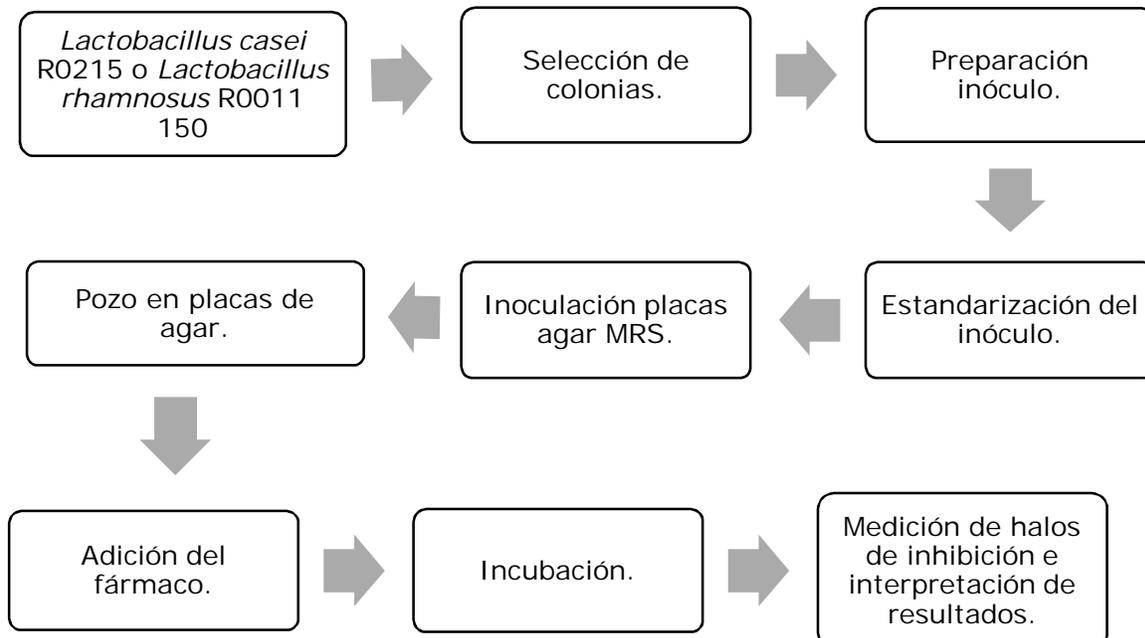
- ***Lactobacillus rhamnosus R0011*** (Rossell-11)
- ***Lactobacillus casei R0215*** (Rossell-251)

## 4.2 Metodologías.

**Metodología para determinar las cinéticas de desarrollo microbiano en distintos medios de crecimiento.**



**Metodología para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de los fármacos antineoplásicos sobre las cepas.**



#### **4.2.1 Metodología para determinar las cinéticas de desarrollo microbiano en distintos medios de crecimiento.**

##### **4.2.1.1 Preparación cultivo stock.**

Con el fin de tener en las mismas condiciones a los microorganismos en cada cinética realizada, se prepararon gliceroles de cada bacteria ácido láctica previamente activadas en caldo MRS. La activación se realizó con 1 g de cada cepa liofilizada en 100 mL de caldo MRS estéril, incubado por 12 horas a 37° C en aerobiosis de forma estacionaria, en matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón de algodón. Los cultivos stock se prepararon con 8 mL de la cepa activada y 8 mL de glicerol como agente crioprotector y la combinación resultante se conservó en tubos Falcon de 15 mL.

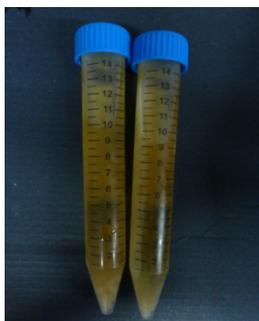


Fig. 4. Cultivo stock de cepas de estudio.

##### **4.2.1.2 Preparación del inóculo (activación cultivo stock)**

Las cepas conservadas en glicerol se reactivaron incubándolas por 12 horas a 37°C en aerobiosis, sin agitación. Se adicionó un tubo Falcon con 15 mL de cultivo stock a 100 mL de caldo MRS. El tiempo de activación de las cepas fue de aproximadamente de 3-5 horas, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.411 ( $1 \times 10^9$  UFC/mL).

#### **4.2.1.3 Estandarización tamaño de inóculo**

Con el fin de establecer una concentración inicial conocida de cada microorganismo al inicio de las cinéticas y poder cuantificar si este número se incrementó al final de la incubación al término de 23 horas, se estableció un tamaño de inóculo inicial de  $1 \times 10^7$  UFC/mL. Este tamaño de inóculo se determinó por una escala de McFarland realizada para el espectrofotómetro disponible en el laboratorio. La escala de McFarland se realizó de la siguiente forma:

Se identificaron los tubos con las claves indicadas en la tabla 5. Se agregó a cada uno el volumen de cloruro de bario indicado en dicha tabla mediante una bureta de 1.0 mL, El de ácido sulfúrico se agregó con la bureta de 10.0 mL. Se determinó la turbidez con el espectrofotómetro tras calibrar el aparato con un tubo que contiene agua. Las lecturas se graficaron y en el eje de las ordenadas se colocaron los valores de densidad óptica registrados, mientras que el de las abscisas, el número aproximado de bacterias representado, de acuerdo a la tabla 6.

Tabla 5. Escala de Mc. Farland. Preparación.

<b>TUBO</b>	<b>BaCl<sub>2</sub> 1.0%</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0%</b>	<b>NÚMERO APROXIMADO DE BACTERIAS REPRESENTADAS x 10<sup>6</sup> / mL</b>
<b>1</b>	0.1	9.9	300
<b>2</b>	0.2	9.8	600
<b>3</b>	0.3	9.7	900
<b>4</b>	0.4	9.6	1200
<b>5</b>	0.5	9.5	1500
<b>6</b>	0.6	9.4	1800
<b>7</b>	0.7	9.3	2100
<b>8</b>	0.8	9.2	2400
<b>9</b>	0.9	9.1	2700
<b>10</b>	1	9	3000

Tabla 6. Escala de McFarland. Interpretación.

<b>Número aprox. bacterias</b>	<b>D.O.</b>
<b>300</b>	0.162
<b>600</b>	0.251
<b>900</b>	0.352
<b>1200</b>	0.471
<b>1500</b>	0.598
<b>1800</b>	0.682
<b>2100</b>	0.818
<b>2400</b>	0.915
<b>2700</b>	1.073
<b>3000</b>	1.232

(Camacho, A, et al., 2007. ).

#### **4.2.1.4 Preparación de los medios de fermentación.**

Los medios de cultivo donde se llevaron a cabo las fermentaciones se prepararon conforme a las indicaciones de preparación del proveedor y se esterilizaron a 121°C por 15 min:

- Caldo MRS para bacterias lácticas.
- Leche Svelty descremada reconstituida al 12% p/v.
- Bebida de amaranto "Naturalmente Alegría" reconstituida al 10% p/v.

#### **4.2.15 Fermentación**

El desarrollo de las cepas se evaluó en caldo MRS para lactobacilos, en leche Svelty descremada en polvo y en la bebida de amaranto. Se inocularon 99 mL del medio de cultivo en donde se evaluaría la cinética de desarrollo bacteriano, adicionado con 1 mL de inóculo previamente activado de cada cepa, cuya concentración es de  $1 \times 10^9$  UFC/mL en caldo MRS. La concentración inicial al tiempo cero fue de  $1 \times 10^7$  UFC/mL. El medio inoculado de esta forma se incubó por 23 horas a 37°C en aerobiosis y sin agitación.

#### **4.2.1.6 Cinética del desarrollo microbiano por plaqueo en agar MRS**

Se realizaron diluciones decimales seriadas del medio fermentado (homogeneizado con vórtex por 30 segundos a velocidad media antes de diluir y en cada dilución) en solución salina (1 mL de medio fermentado/ 9 mL solución salina al 0.85%) hasta una dilución igual a  $1 \times 10^{-8}$  cada tres horas por un período de 23 horas. Se utilizaron las diluciones  $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-8}$  para realizar el plaqueo por vertido en placa, el cual consiste en colocar un mL de cada dilución en cajas de Petri y

adicionar aproximadamente 21 mL de agar MRS fundido y enfriado a 45°C. Una vez vertido el agar MRS se homogeniza con el inóculo, mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás hacia adelante, sobre una superficie lisa y horizontal. Se cuida que no se moje la cubierta de las cajas y se dejan solidificar. El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorporó al diluyente hasta que finalmente se adicionó el medio de cultivo a las cajas, no excedió de 20 min. Finalmente se incubaron las placas solidificadas, de forma invertida por  $48 \pm 2$  horas a 37°C en aerobiosis, condiciones de incubación para cuenta en placa de mesófilos.

Después de la incubación, se seleccionaron las cajas con un rango de 25-250 UFC/placa para cuenta en placa de bacterias mesofílicas. Los resultados se expresaron en UFC/mL del medio fermentado, aplicando los factores de dilución correspondientes, redondeado el número de microorganismos a 2 cifras significativas y potencias de 10, y especificando las condiciones de cultivo.

El desarrollo de las cepas en caldo MRS se realizó en dos ocasiones diferentes para cada microorganismo y la evaluación del desarrollo de las cepas en los medios de prueba se realizó en tres ocasiones diferentes.

#### **4.2.1.7 Cinética del desarrollo microbiano por turbidimetría**

El seguimiento del desarrollo de las cepas en caldo MRS, se determinó cada 3 horas hasta un período final de 23 horas. Se empleó 1 mL del fermentado/ 9 mL de solución salina (0.85%). Esta dilución se leyó en el espectrofotómetro a dos longitudes de onda, 480 y 600 nm. Se utilizó como blanco caldo MRS estéril y posteriormente se registraron las lecturas de densidad óptica, en dos ocasiones diferentes.

El crecimiento de las bacterias en los medios de interés reconstituídos, leche Svelty descremada en polvo y la bebida de amaranto en polvo, se realizó tomando 1 mL del fermentado cada 3 horas por un período de 23 horas. Este mL de fermentado se diluyó 1:10 con EDTA (0.2%, pH 12), con el fin de clarificar el medio. Las proteínas de caseína son el componente mayoritario que da la turbidez a la leche, el pH 12 dado por la adición de NaOH a la solución clarificadora permite solubilizar las micelas de caseína; y el EDTA permite evitar la agregación de las bacterias entre sí por la presencia del NaOH (Kanasaki, 1975). La clarificación se llevó a 4°C por 20 min y el blanco utilizado fue con EDTA (0.2%, pH 12). Las lecturas de densidad óptica se realizaron a 480 y 600 nm, en tres ocasiones diferentes para cada cepa en cada medio.

#### **4.3.1 Metodología de la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los fármacos antineoplásicos sobre las cepas BAL**

Las pruebas de sensibilidad de las cepas hacia los antineoplásicos probados se realizaron por el método de difusión de fármacos modificado con pozos en agar, siguiendo los lineamientos del manual de pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos, elaborado por el Comité para la Estandarización de Laboratorios Clínicos (NCCLS) con el fin de realizar las pruebas de la forma lo más estandarizada y con posibles resultados reproducibles. Se partió de las cepas puras aisladas, liofilizadas y comerciales. Se realizó la metodología para las dos cepas en tres ocasiones diferentes.

Las etapas de la metodología de la concentración mínima inhibitoria (MIC) son:

- La selección de colonias.
- Preparación del inóculo.
- Estandarización del inóculo.
- Inoculación de las placas de agar MRS.
- Elaboración de pozos en placas de agar MRS.
- Adición de fármacos.
- Incubación.
- Medición de halos de inhibición.
- Interpretación de resultados.

#### **4.3.1.1 La selección de colonias**

De cultivos provenientes de placas de agar MRS incubadas a 37°C por 18-24 horas, se seleccionaron de 3-5 colonias de la cepa pura, en vez de una colonia, permitiendo detectar una mayor probabilidad de resistencia.

#### **4.3.1.2 Preparación y estandarización del inóculo**

La preparación del inóculo fue mediante la suspensión 3 colonias aisladas y puras, en un tubo con tapón de rosca con 10 mL de caldo MRS recién preparado. Se incubó la suspensión bacteriana a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.713 ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) a 600 nm según la escala de McFarland. Los inóculos estandarizados se utilizaron antes de pasar 20 min de haber alcanzado la densidad óptica adecuada.

#### **4.3.1.3 Inoculación de placas de agar MRS**

Se inocularon placas de agar MRS con la suspensión bacteriana estandarizada ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). El inóculo se realizó de forma extensiva con hisopos impregnados con la suspensión bacteriana, eliminando el exceso de líquido. La extensión del inóculo se realizó de adelante hacia atrás sobre toda la superficie de la placa, posteriormente se giró 60 ° y se repitió la extensión, en tres ocasiones, con la finalidad de distribuir homogéneamente el inóculo. Las placas se prepararon con 26 mL de agar MRS (aproximadamente 5 mm de profundidad).

#### **4.3.1.4 Elaboración de pozos en placas de agar MRS**

Se perforaron pozos en las placas de agar MRS, con penicilindros de 7 mm de diámetro y 1 cm de largo, con la ayuda de palillos de madera y pinzas de disección estériles. Se formaron 6 pozos por cada placa de agar MRS, cuidando de no rasgar el agar y tener una separación de 1.5 cm entre cada pozo.

#### **4.3.1.5 Adición de fármacos**

A cada pozo en las placas de agar MRS se le adicionaron 80 µL de cada concentración del fármaco a probar.

#### **4.3.1.6 Incubación**

Una vez absorbidas las diluciones de los fármacos en el agar MRS (2-5 horas), las placas se invertían e incubaban a 37°C por 18-24 horas en aerobiosis.

#### **4.3.1.7 Medición de halos de inhibición e interpretación de resultados**

Se utilizó un fondo negro que permitiera distinguir bien los halos de inhibición, una regla para la medición de los halos de inhibición y la concentración mínima inhibitoria(MIC) se considera por la concentración más baja del fármaco que causa inhibición en el crecimiento de la cepa probada.

#### **4.3.1.8 Preparación de las disoluciones de fármacos, concentraciones a probar.**

Las diluciones se llevaron a cabo en tubos Falcon de 15 mL, tubos eppendorf de 2 mL, y puntas de 1000 µL y 100 µL estériles). Se trabajó en campana de flujo laminar y con espátula estéril para evitar contaminación. El diluyente utilizado fue solución salina estéril (0.95%) para todos los fármacos. El tiempo después de la reconstitución y dilución de los fármacos no fue mayor a dos horas, tiempo en el que se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

Las concentraciones de los fármacos se escogieron con base en las concentraciones estimadas del fármaco en plasma, que pudieran presentar mujeres mexicanas de un rango de edad de 18-25 años. (Ver apéndice 8.3).

##### **4.3.1.8.1 Concentraciones de doxorrubicina.**

Se prepararon diluciones seriadas de doxorrubicina con factor de dos en un rango de 8 mg/mL a  $1.22 \times 10^{-4}$  mg/mL de doxorrubicina. El diluyente utilizado fue solución salina al 0.95%.

Las pruebas de la MIC para ambas cepas se iniciaron por la concentración más baja de doxorrubicina ( $1.22 \times 10^{-4}$  mg/mL). Se probaron seis concentraciones diferentes por placa. La prueba se realizó en tres ocasiones para ambas cepas.

#### **4.3.1.8.2 Concentraciones de metotrexato.**

Se prepararon diluciones seriadas con factor de dos en un rango de 1 mg/mL a  $4.77 \times 10^{-7}$  mg/mL, a partir de metotrexato (25 mg/mL) y como diluyente solución salina al 0.95%.

Las pruebas de la MIC para ambas cepas se iniciaron con la concentración más alta de metotrexato (1 mg/mL). Se probaron seis concentraciones diferentes por placa. La prueba se realizó en tres ocasiones para ambas cepas.

#### **4.3.1.8.3 Concentraciones de paclitaxel.**

Se prepararon las siguientes diluciones seriadas con factor de dos en un rango de 4.8 mg /mL a  $9 \times 10^{-3}$  mg/mL, utilizando como diluyente solución salina al 0.95%.

Las pruebas de la MIC para ambas cepas se iniciaron por la concentración más baja de paclitaxel ( $9 \times 10^{-3}$ mg/mL). Se probaron seis concentraciones diferentes por placa. La prueba se realizó en tres ocasiones para ambas cepas.

## Capítulo V. Resultados y análisis de resultados

### 5.1 Determinación del tamaño del inóculo

Según lo recomendado por “la asociación de leches fermentadas y bebidas con bacterias ácido lácticas “con sede en Japón. Se sugiere que una bebida fermentada con probióticos contenga al menos una concentración de microorganismos del orden de  $1 \times 10^7$  UFC/mL o una cantidad mayor para que se observe un efecto benéfico en la salud en quien lo consume,

Para la elaboración de las bebidas fermentadas y la evaluación del crecimiento de las cepas ácido lácticas de interés en los diferentes medios de crecimiento, se fijó una cantidad inicial de microorganismos de  $1 \times 10^7$  UFC/mL del medio a fermentar cuyo volumen final fue 100 mL. Para obtener la concentración deseada de probióticos por mL del medio se inocularon 99 mL del medio a fermentar con un mL de inóculo cuya concentración de la bacteria ácido láctica fuese de  $1 \times 10^9$  UFC/mL.

Se elaboró y utilizó una escala de Mcfarland para calcular indirectamente la cantidad de células por mililitro ( $1 \times 10^9$  UFC/mL). La escala de Mcfarland relaciona la turbidez de unos patrones de sulfato de bario (mezcla de cloruro de bario al 1% y ácido sulfúrico al 1%) con el número de bacterias presentes en una muestra. Así, por ejemplo, como se muestra en la tabla 7: si la muestra presenta la misma turbidez que el patrón 1 de la escala McFarland, la carga microbiana será aproximadamente de  $3 \times 10^8$  UFC/mL.

Tabla 7 Escala McFarland				
Patrón	BaCl <sub>2</sub> al 1% (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 1% (ml)	UFC/ml (x10 <sup>8</sup> )	D.O (600nm) experimental
1	0,1	9,9	3	0.162
2	0.2	9,8	6	0.251
3	0,3	9,7	9	0.352
4	0,4	9,6	12	0.471
5	0,5	9,5	15	0.598
6	0,6	9,4	18	0.682
7	0,7	9,3	21	0.818
8	0,8	9,2	24	0.915
9	0,9	9,1	27	1.073
10	1,0	9,0	30	1.232

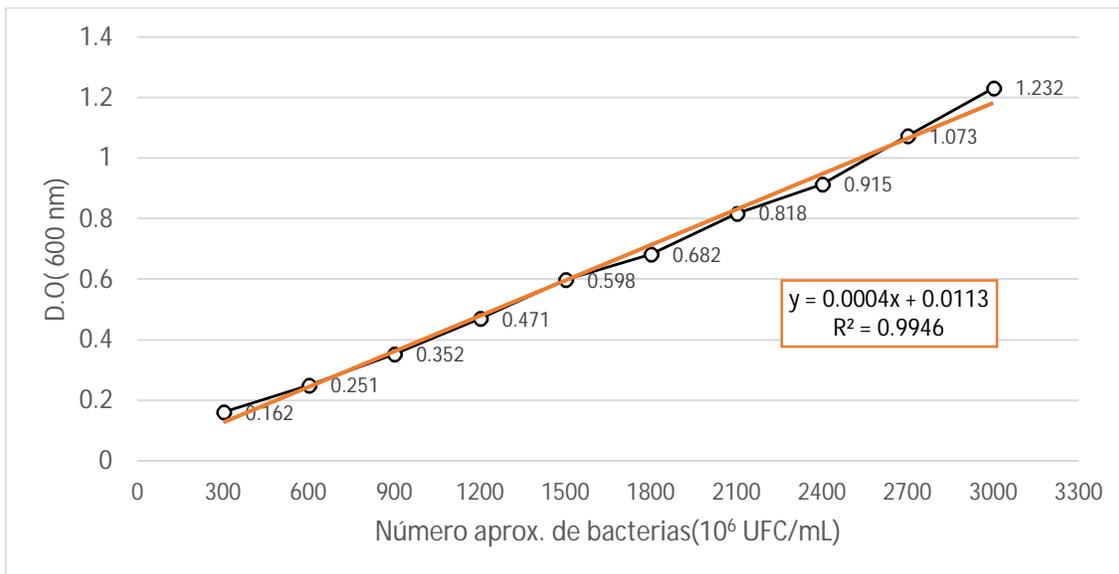


Fig. 5: Escala de MacFarland.

Se determinó la turbidez con el espectrofotómetro tras calibrar el aparato con un tubo que contiene agua. Las lecturas de densidad óptica que presentó cada patrón de sulfato de bario se graficaron en el eje

de las ordenadas, mientras que el de las abscisas, el número aproximado de bacterias representado, de acuerdo figura 5.

Utilizando la regresión lineal de la escala de McFarland (fig. 5) se determinó que  $1 \times 10^9$  UFC/mL del microorganismo presentaría una absorbancia de 0.4113 a una longitud de onda 600 nm. Posteriormente se realizó la activación de la cepa hasta una densidad óptica de 0.4113 cuya concentración inicial de inóculo es de  $1 \times 10^9$  UFC/mL. Una vez alcanzada la concentración deseada se inóculo en 99 mL del medio a fermentar para obtener una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  UFC/mL al inició del crecimiento bacteriano.

De igual forma se utilizó la escala de Mcfarland para estandarizar el tamaño de inóculo requerido para la prueba de la concentración mínima inhibitoria que tienen los antineoplásicos sobre las cepas probióticas.

El tamaño de inóculo al inicio de todas las cinéticas de crecimiento, fue del orden  $10^7$  UFC/mL al tiempo inicial, ver figuras 6 y 7. Este tamaño de inóculo coincide con el tamaño de inóculo estimado con la escala de Macfarland. Dado lo anterior se consideró que la escala de McFarland permitió estandarizar el tamaño de inóculo de los probióticos y el tamaño de inóculo en las pruebas de inhibición.

## **5.2 Evaluación de crecimiento en diferentes medios de cultivo**

### **5.2.1 Cinéticas de crecimiento**

Es indispensable comprobar que las cepas probadas alcancen un crecimiento mayor a la concentración inicial establecida ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) y así poder determinar que los medios de cultivo propuestos permiten el desarrollo de los probióticos, y con esto:

- Garantizar una mayor posibilidad de obtener metabolitos que permitan al alimento tener una vida de anaquel mayor, por un efecto antagónico sobre otros microorganismos: mediante la reducción del pH del medio, efecto del metabolismo de carbohidratos; por efecto de la producción bacteriocinas y otros metabolitos como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Permitir el desarrollo de las cepas en los medio de fermentación, ya que la condición heterofermentativa de ambas cepas permite la producción de compuestos que intensifican el sabor y aromas tales como acetaldehído y diacetilo.
- Es de considerar que en el almacenamiento los probióticos están propensos a perder viabilidad y con ello alcanzar una reducción en su efectividad. Por lo cual un número mayor de microorganismos permitirá tener un número adecuado de microorganismo viable en un período de vida de anaquel más largo.

Por tanto, se muestra el crecimiento de las cepas ácido lácticas en el caldo MRS, leche descremada Svelty y bebida de amaranto.

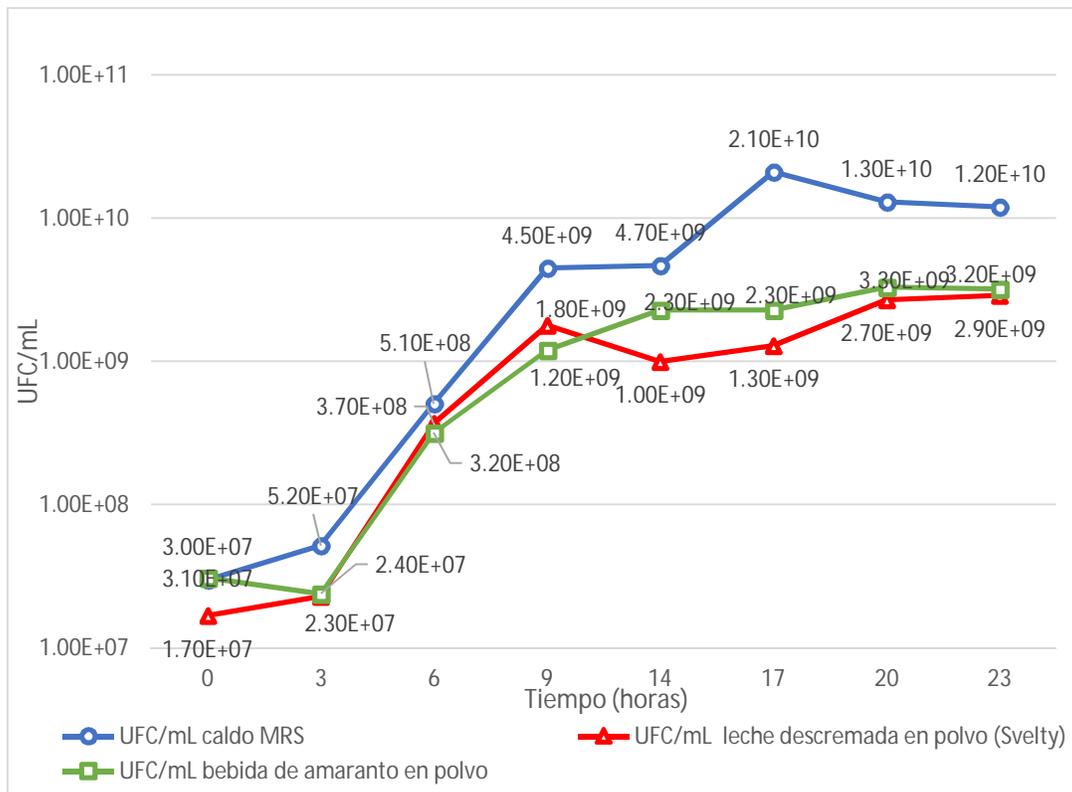


Fig. 6: Crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 en caldo MRS, leche Svelty y la bebida de amaranto.

Se observa en la fig. 6 que *Lactobacillus casei* R0215 presenta una etapa de adaptación muy corta, en la leche Svelty y en la bebida de amaranto, alrededor de 3 horas después del ser inoculadas. La etapa de adaptación de *Lactobacillus casei* R0215 al caldo MRS no se observa, pues la cepa fue reactivada previamente en caldo MRS por 12 horas a 37° C, por lo que ya estaba adaptada a este medio de cultivo .

La fase exponencial de desarrollo de *Lactobacillus casei* R0215 en caldo MRS, se observa de la hora 3 a la hora 17, cuyas densidades microbianas (UFC/mL) son  $5.20 \times 10^7$  y  $2.10 \times 10^{10}$  respectivamente. En la hora 17 *Lactobacillus casei* R0215 alcanzó un número máximo ( $2.10 \times 10^{10}$  UFC/mL de caldo MRS). El desarrollo de esta cepa presenta una tasa de crecimiento de 0.618 generaciones por hora (g/h), lo que

indica que se duplicó se cada 1.62 horas durante su desarrollo exponencial. Posteriormente comienza una etapa de muerte celular.

La fase logarítmica del desarrollo del microorganismo en leche Svelty también inicia a la hora 3 y termina en la hora 9, cuyas densidades microbianas son de  $2.30 \times 10^7$  a  $1.80 \times 10^9$  UFC/mL respectivamente. *Lactobacillus casei* R0215 presentó una tasa de crecimiento (k) de 1.048 g/h y una duplicación cada 0.95 h. Posteriormente ya no hay desarrollo del microorganismo, aunque se observa una ligera recuperación en las últimas horas de la fase estacionaria.

La fase logarítmica de *Lactobacillus casei* R0215 en la bebida de amaranto comenzó de igual forma, a la hora 3 y a la hora 14, cuyas densidades microbianas son  $2.40 \times 10^7$  de  $2.30 \times 10^9$  UFC/mL respectivamente en leche Svelty. La cepa presenta una tasa de crecimiento de 0.598 g/h, con una duplicación en su número de células cada 1.67 h durante la fase de crecimiento exponencial. Posterior a la hora 14 se observa una fase estacionaria del desarrollo de microorganismo.

Se aprecia en la figura 6 que el caldo MRS permite un mejor desarrollo de *Lactobacillus casei* R0215 en comparación al observado en la leche Svelty y en la bebida de amaranto, medios que le permiten crecer dos órdenes de magnitud. Esto es de esperarse ya que el caldo MRS es un medio de crecimiento específico para microorganismos de requerimientos nutrimentales altos como lo son los lactobacilos. Sin embargo, dado el crecimiento máximo alcanzado por *Lactobacillus casei* R0215 tanto en leche Svelty como en la bebida de amaranto se puede afirmar que cualquiera de los dos medios de cultivo se puede emplear para la propagación del microorganismo.

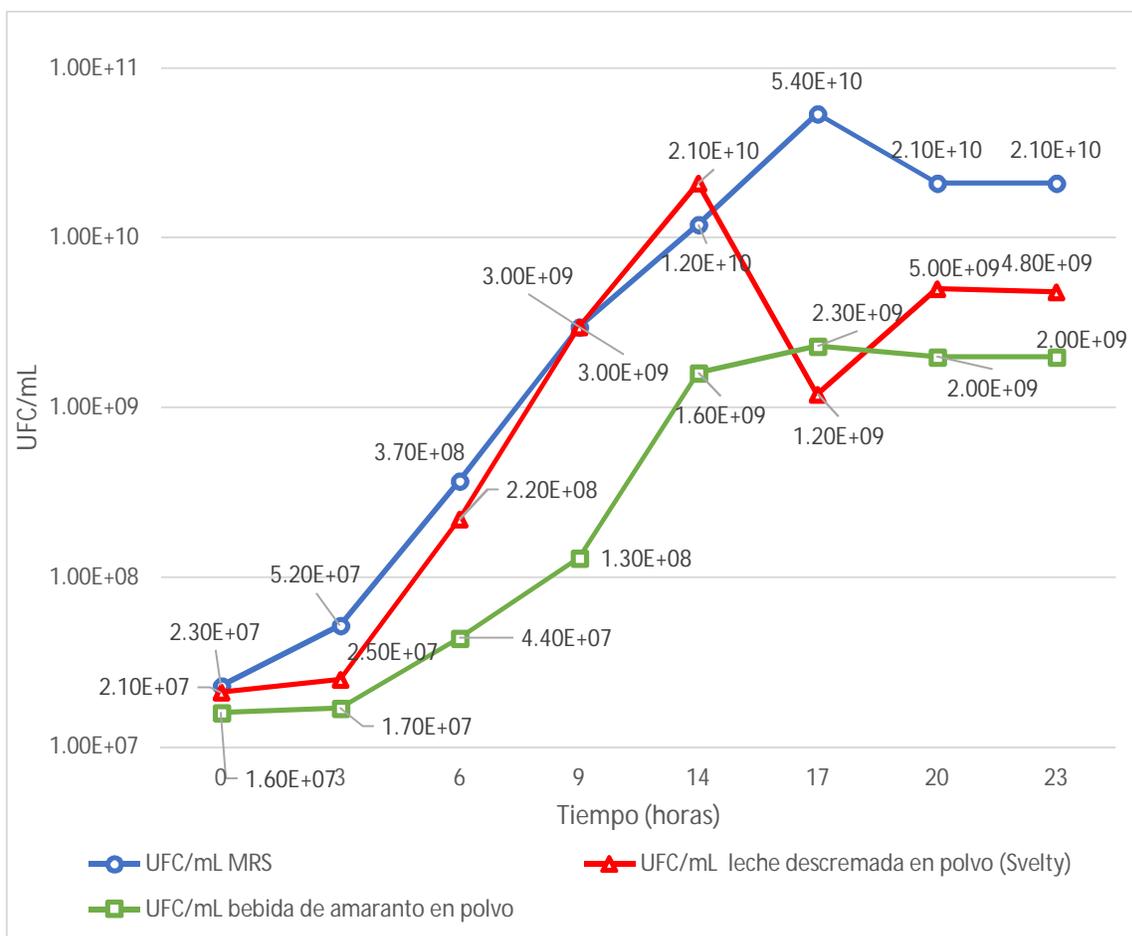


Fig. 7: Crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en caldo MRS, leche Svelty y la bebida de amaranto.

*Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 no requiere adaptación al caldo MRS (fig. 7), por la reactivación previa que se hizo en este medio. Esta fase de adaptación es perceptible, en cambio, tanto en leche Svelty como en bebida de amaranto entre el tiempo 0 y la hora 3.

En caldo MRS, a la hora 17 alcanzó el máximo de densidad microbiana ( $5.4 \times 10^{10}$  UFC/mL), tras lo cual la población presenta un leve descenso y estabilización. En la leche Svelty el máximo se presentó a las 14 h ( $2.1 \times 10^{10}$  UFC/mL), tras lo que ocurrió un descenso pronunciado de viabilidad y se mantuvo estable. En la bebida de amaranto también

alcanza el máximo a la hora 14 ( $1.60 \times 10^9$  UFC/mL) y la población se estabiliza.

La fase logarítmica del crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en caldo MRS comenzó desde el inicio de la cinética (hora cero) hasta la hora 17, cuyas densidades microbianas presentadas fueron de  $2.30 \times 10^7$  UFC/mL y de  $5.4 \times 10^{10}$  UFC/mL respectivamente en caldo MRS. La cepa presentó una tasa de desarrollo microbiano de 0.799 generaciones por horas (g/h), con una duplicación en su número cada 1.25 horas.

La fase exponencial de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en leche Svelty inició en la hora 3 y terminó a la hora 14, con densidades microbianas de  $2.50 \times 10^7$  de  $2.1 \times 10^{10}$  UFC/mL respectivamente. La tasa de crecimiento microbiano de la cepa en este medio fue de 0.888 g/h, duplicándose cada 1.13 h durante la fase logarítmica de su desarrollo.

La fase logarítmica de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en bebida de amaranto comienza en la hora tres de la cinética y termina a la hora 14, alcanzó una densidad microbiana de  $1.70 \times 10^7$  y  $1.60 \times 10^9$  UFC/mL respectivamente. La cepa presenta una duplicación en su número cada 1.68 horas durante el desarrollo exponencial.

En la fig. 7 se aprecia que el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 es mejor en caldo MRS, un orden de magnitud más en comparación con la densidad microbiana máxima que se logra en la bebida de amaranto, por las mismas razones explicadas en el caso de la cepa anterior, y ocurre lo mismo con la leche Svelty, aunque en ésta, la pérdida de viabilidad de la cepa es más acentuada.

Finalmente, puede decirse que tanto la leche descremada Svelty como la bebida de amaranto son buenos medios de crecimiento para

*Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 y *Lactobacillus casei* R0215, ya que ambas cepas alcanzan una densidad microbiana entre un rango  $10^9$  a  $10^{10}$  UFC/mL medio en los medios de cultivo evaluados. La densidad microbiana que se logra, tiene un efecto benéfico en la salud, ya que el valor recomendado es de  $10^7$  según la "Asociación de leches fermentadas y bebidas con bacterias ácido lácticas" con sede en Japón. Por otra parte la National Yogurt Association con sede en Estados Unidos, establece una concentración de  $10^8$  UFC/mL, para denominar un producto como "producto con cultivos vivos y activos".

Si bien las bebidas fermentadas presentaron un número determinado de microorganismos por mL de bebida para poder ser denominadas como alimentos funcionales. La dosis de los probióticos a ingerir es de igual importancia para que estos tengan un efecto reductor sobre los efectos secundarios, además de tener un efecto significativo como coadyuvante a la quimioterapia. En base en literatura revisada, se recomienda tener una ingesta de probióticos de un rango de  $2 \times 10^8$  a  $24 \times 10^8$  UFC por día, desde el inicio del tratamiento por quimioterapia hasta su fin, periodo de tiempo durante el cual se ha observado efecto coadyuvante a la quimioterapia presentando una disminución en la tasa de crecimiento tumoral de células cancerígenas de mama en modelos murinos (Rachid, M., et al., 2006; Maroof, H., et al., 2011,). Estas cifras son solo una orientación de la cantidad de microorganismos a consumir durante quimioterapia para cáncer de mama y se debe tener en cuenta es estos efectos son en modelos murinos y para cepas de lactobacilos diferentes a los empleados en este trabajo para la fermentación de los medios de estudio

En el caso del CID y del efecto que ofrecen las cepas probióticos se tiene información de que género *Lactobacillus* y su consumo en un orden de  $10^{10}$  a  $10^{12}$  UFC de una a dos veces al día por un periodo de 7 a 14 días

permite paliar las diarreas ocasionadas por el efecto citotóxico de los antineoplásicos empleados durante la quimioterapia de cáncer de mama, así como por otros medicamentos citotóxicos (Abd El-Attis, et al., 2009; WGO, 2011). Esta dosis de cepas probióticas es solo orientativa ya que no son las cepas utilizadas para las bebidas fermentadas en este trabajo, sin embargo indica una magnitud de UFC con las cuales probar los posibles efectos paliativos y coadyuvantes a la quimioterapia que pueden brindar las cepas de probióticas.

A continuación se muestran los resultados correspondientes a la determinación de pH durante el monitoreo de las cinéticas de crecimiento para cada cepa

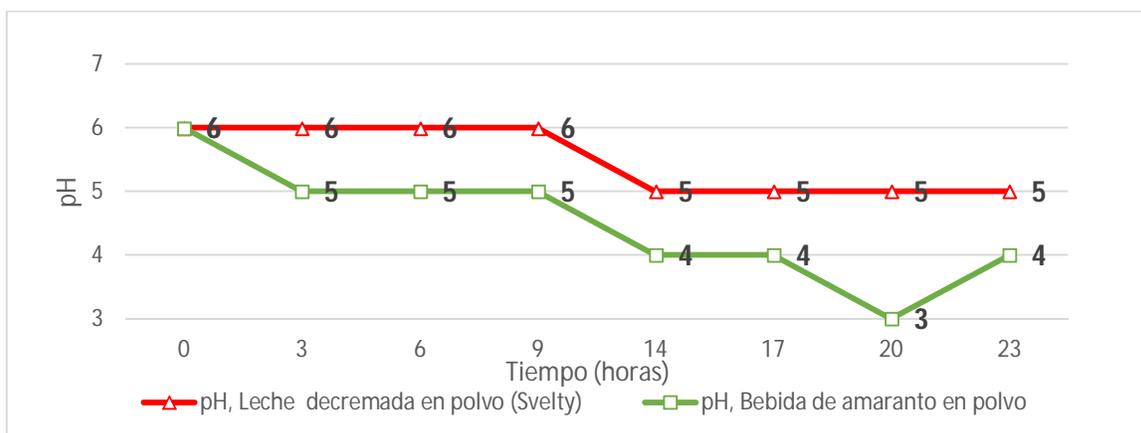


Fig. 8. pH durante el crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 en Svelty y en bebida de amaranto.

En la gráfica anterior (Fig. 8) se aprecia una disminución del pH en ambos medios de cultivo por parte del metabolismo de carbohidratos de *Lactobacillus casei* R0215. Esta disminución de pH en leche es provocada por la producción de ácido láctico y otros ácidos orgánicos, (en menor proporción, acetaldehído y diacetilo y ácido acético), productos de fermentación heterofermentativa de la especie de *Lactobacillus casei*. La diferencia en el pH que presenta un medio de

cultivo de otro puede ser ocasionada por el efecto amortiguador que presenta la leche Svelty y no así en la bebida de amaranto, posiblemente por una mayor presencia de ácidos débiles o bases débiles, como por ejemplo el ácido cítrico, ácido láctico, el ácido fosfórico y sus respectivas sales. Además, por la presencia de proteínas cuyos grupos amino de las cadenas de aminoácidos, forman iones  $\text{NH}^{3+}$  y alcalinizando el medio. Por lo anterior, el valor de pH se ve menos afectado en la leche Svelty que en la bebida de amaranto. El que tampoco existiera una drástica disminución de pH en los medios evaluados puede atribuirse a la producción no equimolar de ácido láctico por mol de glucosa, es decir la producción de un medio mol de ácido láctico por cada mol de glucosa, fenómeno heterofermentativo, que no permitió una mayor producción en la cantidad de ácido láctico y por lo tanto se presentó una menor disminución de pH.

El pH presentado por los dos medios de crecimiento fue de 5 y 4 para leche Svelty y la bebida de amaranto, respectivamente. Solo la bebida fermentada de amaranto está dentro del rango de pH de productos lácteos acidificados, los cuales tienden a presentar un rango de pH de 3.9-4.5.

Una disminución de pH permite la inhibición de microorganismos de putrefacción, tales como *Escherichia coli* el cual tiene una inhibición en su metabolismo, a un pH por abajo de 6, impidiendo la degradación de proteínas que genera malos olores y colores desagradables. Sin embargo, también es de vital importancia el evitar una posible contaminación de mohos y levaduras que proliferan a pH ácidos.

El medio de fermentación basado en leche Svelty presentó precipitación de proteínas al final de 23 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ , no presentó aromas desagradables, pero sí un color lechoso. La

precipitación de las proteínas de leche ocurre porque las caseínas, que conforma el 76% de las proteínas totales en la leche de vaca, precipitan al alcanzar el pH de su punto isoeléctrico de 4.6-4.9, cercano al pH de 5 de la leche fermentada, además del daño térmico sufrido en el momento de la esterilización en autoclave. Esta situación pudiese tener una impresión desfavorable en el consumidor final en un producto comercial ya que la presentación no es homogénea.

La bebida fermentada de amaranto con *Lactobacillus casei* R0215 no presentó aromas desagradables, el medio de cultivo mostró un color lechoso y no se presentó la precipitación de proteínas.

La bebida de amaranto fermentada con *Lactobacillus casei* R0215 presenta una densidad máxima microbiana de  $10^9$  UFC/mL, la misma que alcanzó esta cepa en leche Svelty. La bebida fermentada de amaranto presentó un pH 4, más bajo que el obtenido con leche Svelty, cuyo pH fue de 5. Un menor pH representa un mejor efecto antagónico sobre microorganismos patógenos y mayor garantía de biopreservación del alimento funcional aunque puede provocar precipitación de proteínas lácteas y, por lo tanto tener un menor atractivo visual y organoléptico, como lo que sucedió en la leche Svelty. Lo anterior permite afirmar que la bebida de amaranto presenta mejores características para ser considerada como medio de elección para el desarrollo de *Lactobacillus casei* R0215.

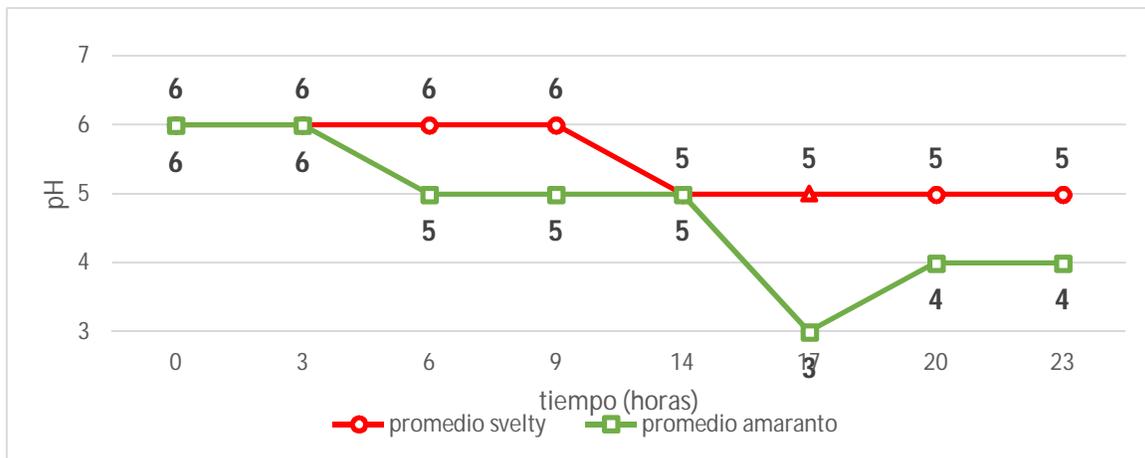


Fig. 9. pH durante el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en leche Svelty y en bebida de amaranto.

Se observa que el menor pH desarrollado se alcanza a la hora 14 de iniciado el crecimiento y coincide con el tiempo donde se genera una densidad máxima microbiana. La disminución de pH en la bebida de amaranto fermentada por la misma cepa, presenta una mayor reducción del pH con respecto al obtenido en la fermentación de la leche de amaranto, por efecto del metabolismo de carbohidratos de la cepa.

La bebida fermentada de amaranto con *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 tampoco presentó aromas desagradables, el medio mostró un color lechoso y no sufrió precipitación de proteínas.

### **5.3.2 Determinación de desarrollo microbiano en diferentes medios por espectrofotometría**

El seguimiento del crecimiento de bacterias por medios espectrofotométricos presentó múltiples dificultades. La turbidez presentada por los medios evaluados era tan alta que no permitía apreciar la turbidez provocada por el desarrollo de los microorganismos. Para resolver este problema, se utilizó la técnica de Kanasaki (1975), la cual consiste en realizar una clarificación de ambos medios de cultivo, utilizando como agente clarificante EDTA (0.2%, pH 12). En la leche las micelas de caseína son las responsables, en mayor parte, de la turbidez que presenta. La condición alcalina del EDTA (0.2%, pH 12) permite disolver las micelas de caseína en la leche Svelty y con ello lograr una clarificación del medio. La clarificación de la bebida de amaranto ocurrió en menor proporción, lo que sugiere que la turbidez de este medio de cultivo no está relacionado con la presencia de estructuras similares a las de las micelas de caseína.

La medición de la turbidez a diferentes longitudes de onda solo permitió ver que a una longitud de onda menor (480 nm) se detectan lecturas de turbidez más altas que las registradas a 600 nm, en el caso de medios que presentan densidad óptica alta, como la leche Svelty y la bebida de amaranto. Para medios de crecimiento cuya turbidez no resultó un obstáculo, para seguir el desarrollo bacteriano, como el ocurrido en el caldo MRS, no se aprecia una diferencia de turbidez tan marcada entre lecturas por lecturas tomadas con diferentes longitudes de onda (480 y 600 nm), como ocurrió en los otros dos medios de cultivo evaluados, salvo en las últimas horas de las cinéticas de desarrollo.

A continuación se muestra el seguimiento de la cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en los medios de cultivo para análisis por espectrofotometría:

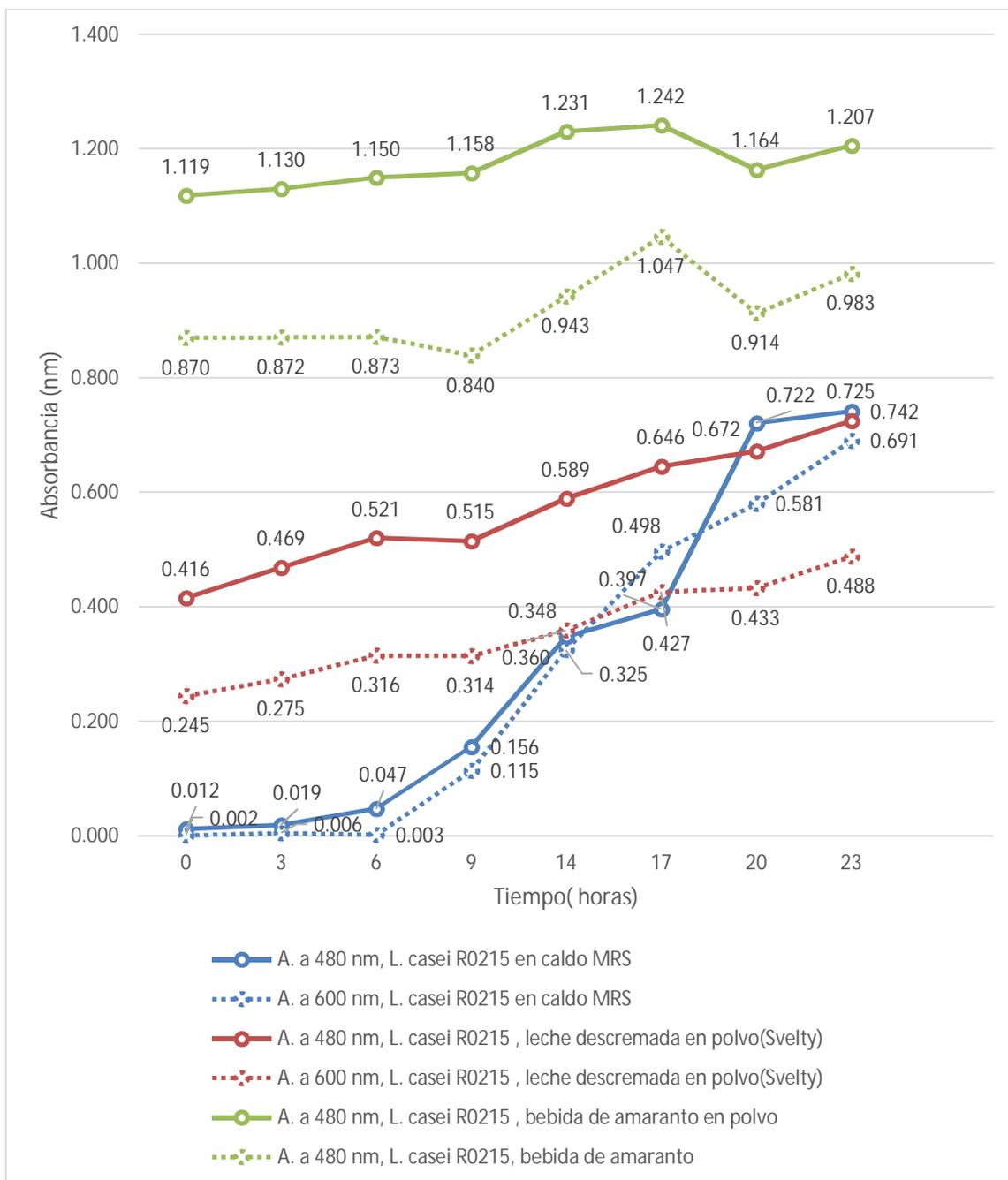


Fig. 10. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 en los medios de cultivo para análisis por espectrofotometría.

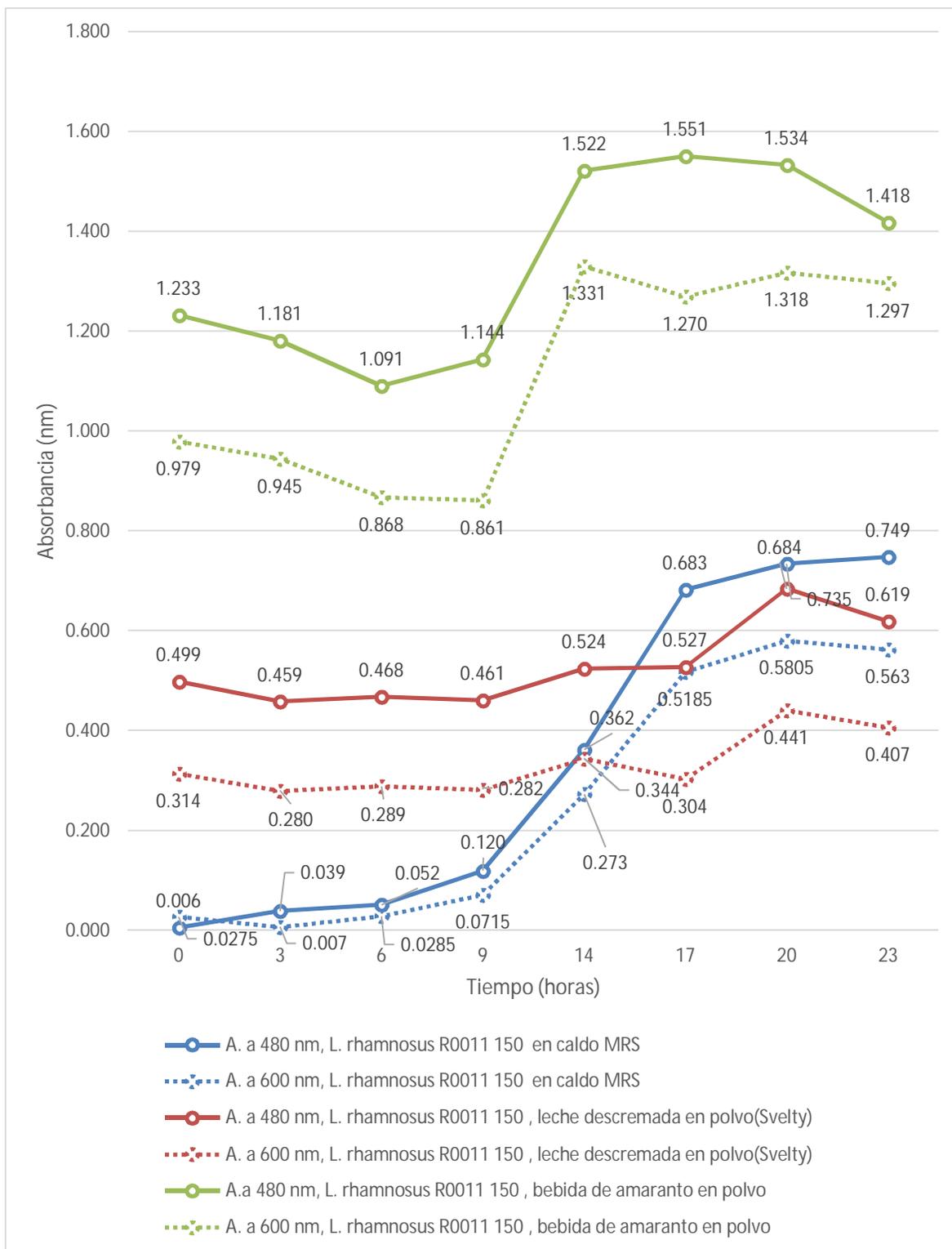


Fig.11. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en diferentes medios de cultivo, seguida por espectrofotometría.

En la figura 10 se aprecia que el desarrollo de *Lactobacillus casei* R0215 en los medios de cultivo aumentó hasta la última hora, lo que no coincide con lo observado en el seguimiento del crecimiento por la técnica de plaqueo. El incremento de la densidad óptica, después de la hora 17, se debe al que el método espectrofotométrico detecta tanto células viables como otras partículas, como células muertas, por lo que la técnica no permite determinar en qué momento del crecimiento hay un mayor número de células viables o cuándo se empieza a perder la viabilidad.

En la determinación de la cinética de desarrollo de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 (fig.11) no se observó un incremento de la turbidez después de la hora 20, así como ocurrió con *Lactobacillus casei* R0215. Lo que se observa en la mayoría de las cinéticas es una disminución de la turbidez de la hora 20 a la hora 23, proponiendo que la cepa se encuentra en fase de muerte celular, que no se aprecia cuando se realiza el seguimiento del crecimiento de la cepa por plaqueo, ya que entonces se observa una fase estacionaria.

El mayor impedimento de esta técnica espectrofotométrica es no poder comparar el desarrollo de una misma cepa en medios de crecimiento con turbidez diferente.

### **5.3.3 Aporte nutrimental de las bebidas fermentadas de amaranto y leche Svelty.**

Debido a la enfermedad de cáncer de mama, las alteraciones metabólicas inducidas por el tumor, el cambio fisiológico producido por los efectos del tratamiento oncológico y la presencia de síntomas (estrés, depresión, anorexia, vómitos, diarrea, dolor, etc.), aparece en algunos casos una desnutrición calórica proteica severa, exacerbada por el incremento del gasto energético y la ingesta deficiente del paciente. Por lo cual el consumo de alimentos ricos en energía durante la quimioterapia es de vital importancia, para no padecer una desnutrición durante el régimen de quimioterapia del tratamiento.

Con el fin de evaluar el aporte calórico y nutrimental que proporcionan las bebidas fermentadas se realizó una estimación de su posible contenido nutrimental de acuerdo al tamaño de las porciones utilizadas los productos comerciales al ser reconstruidos. (Ver apéndice 8.4, tablas 40 y 41)

Al comparar el contenido energético que proporciona el consumo de 100 mL de las bebidas fermentadas de amaranto y de Svelty, con el requerimiento energético diario que una mujer saludable necesita diariamente (1600-1800 Kcal, según la Secretaría de Salud de México), se concluye que las bebidas fermentadas por ambas cepas no resultaron ser una buena fuente de energía. (ver tabla 8).

El contenido proteínico en la bebida fermentada de Svelty es 3 veces superior en comparación de la bebida fermentada amaranto. Considerando un rango de peso de 63-70 kg que presenta la población mexicana femenina el aporte de proteínas por parte del fermentado de amaranto es del 1.86 a 2.63 % de la ingesta diaria recomendada para la población mexicana. La bebida fermentada de leche Svelty aporta de

5.92 a 6.58 % de la ingesta diaria recomendada de proteínas considerando el rango antropométrico antes mencionado para mujeres mexicanas. La bebida fermentada de leche Svelty, si bien contiene una mayor cantidad de proteína que la suministrada por la bebida fermentada de amaranto, el aporte proteínico es bajo, como ocurre con otras bebidas fermentadas.

En cuanto al aporte de micronutrientes, la bebida fermentada de amaranto proporciona el 5.88% del hierro de la ingesta diaria sugerida (IDS) para la población mexicana (ver tabla10 y apéndice 8.4, tabla 42). Si bien no es un valor alto, si representa una fuente de hierro necesaria en pacientes con un estado nutricional desfavorable. Los demás nutrientes están en una concentración muy baja, y no es considerable su aporte nutricional durante la quimioterapia.

En muchas ocasiones la dieta oral es insuficiente para mantener y/o reponer un adecuado estado nutricional, por lo cual está indicado recurrir a los suplementos nutricionales. Desafortunadamente las bebidas fermentadas elaboradas no son una buena fuente calórica, ni proteica ni de más nutrientes, lo que no les permite fungir como suplementos alimenticios de manera significativa. Se podrían enriquecer con otras fuentes para así aportar nutrientes de forma significativa, además de paliar efectos secundarios y coadyuvar a la disminución al desarrollo tumoral y tener efectos sinérgicos junto con los probióticos.

Dentro de los elementos que pueden colaborar al enriquecimiento nutricional de las bebidas fermentadas podemos enlistar a:

- Los ácidos grasos poliinsaturados como lo son el ácido docosapentaenoico (DPA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) se sabe que presentan propiedades paliativas ante la inflamación,

presentar efecto antitumoral por supresión de citoquinas proinflamatorias.

- Durante la utilización de metotrexato se presentan cuadros de anemia por la pérdida de folato y por lo cual un enriquecimiento de las bebidas con ácido fólico (vitamina B9) permitiría compensar esta deficiencia. También la utilización de 5-fluorouracilo durante la quimioterapia implica un déficit de vitamina B por lo cual un enriquecimiento de con este grupo de vitaminas sería adecuado en las bebidas fermentadas.
- Durante la aplicación de cisplatino durante la quimioterapia se observan casos donde existe una pérdida de magnesio cuyo déficit está relacionado con debilidad muscular, náuseas, molestias presentes y comunes durante el tratamiento de cáncer de mama.

Por otra parte se puede observar en la tabla 8 que ambas bebidas fermentadas poseen los nutrimentos necesarios para que crezcan las cepas ácido lácticas se desarrollen.

<b>Información nutrimental.</b>	Por 100 mL bebida fermentada de amaranto (10% p/v)	Por 100 mL bebida fermentada de Svelty (12% p/v)
<b>Contenido energético, Kcal</b>	10.10 Kcal	42.72 Kcal
<b>Proteínas, g</b>	1.30 g	4.15 g
<b>Grasas totales (lípidos), g</b>	0.50 g	0.144 g
<b>De las cuales Grasa saturada, g</b>	0.05 g	0.080 g
<b>Carbohidratos disponibles, g</b>	6.73 g	5.1g
<b>Fibra dietética, g</b>	0.70 mg	--
<b>Sodio, mg</b>	2.29 mg	56.4
<b>Potasio, mg</b>	41.10 mg	--
<b>Calcio, mg</b>	29.8 mg	147.6 mg
<b>Fósforo, mg</b>	80 mg	12.6 mg
<b>Manganeso</b>	0.40 mg	--
<b>Hierro, mg</b>	1.00 mg	--
<b>Tiamina (vitamina B1), µg</b>	14 µg	--
<b>Riboflavina (vitamina B2), mg</b>	0.034 mg	--
<b>Niacina, mg</b>	0.05 mg	--
<b>Vitamina A, µg</b>	--	55.2 µg
<b>Vitamina C, mg</b>	0.45 mg	--
<b>Vitamina D, µg</b>	--	0.42 µg

Fuentes: *Svelty México* y gastronomía molecular.

## 5.4 Resultados de pruebas de concentración mínima inhibitoria de antineoplásicos sobre *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 y *Lactobacillus casei* R0215

### 5.4.1 Concentraciones plasmáticas estimadas de los antineoplásicos a evaluar.

Se realizó un estudio bibliográfico para estimar el rango de concentraciones del fármaco en plasma sanguíneo y fracción libre de éste, ya que es la fracción del fármaco que difunde a los órganos y da el efecto terapéutico. Una vez conocidas las concentraciones del fármaco en el plasma, la fracción libre de éste en sangre y la concentración mínima inhibitoria del fármaco sobre las cepas, es posible determinar si la cepa es tolerante a las concentraciones fisiológicas que el fármaco presenta en regímenes de quimioterapia habituales.

A continuación se muestran las concentraciones estimadas de los antineoplásicos, así como su fracción libre en plasma sanguíneo.

Tabla 9. Concentraciones plasmáticas estimadas de Doxorrubicina, Metotrexato y Paclitaxel, para mujeres mexicanas (18-50 años).					
Fármaco	Cantidades habituales del fármaco empleado vía intravenosa, en monoterapia (mg)	Volumen de distribución (L)	% de unión a proteínas plasmáticas del fármaco (%)	Concentración estimada del fármaco en plasma sanguíneo (mg/mL)	Concentración del fármaco libre, que distribuye a órganos (mg/mL)
Doxorrubicina	24.9 - 130.5	1260 - 2160	85	$1.153 \times 10^{-5}$ - $1.036 \times 10^{-4}$	$1.73 \times 10^{-6}$ - $1.554 \times 10^{-5}$
Metotrexato	66.4 - 139.2	25.2 - 64.8	50	$1.025 \times 10^{-3}$ - $5.524 \times 10^{-3}$	$5.123 \times 10^{-4}$ - $2.762 \times 10^{-3}$
Paclitaxel	224.1- 435	69.72 - 281.88	97	$7.950 \times 10^{-4}$ - $6.239 \times 10^{-3}$	$2.385 \times 10^{-5}$ - $1.87 \times 10^{-4}$

Ver apéndice 8.3 para el cálculo estimaciones de fármacos y sus fracciones libres en plasma sanguíneo.

### **La concentración mínima inhibitoria de los antineoplásicos sobre las cepas probióticas.**

Para que un probiótico tenga un efecto benéfico en la salud este debe ser viable durante su consumo y durante su tránsito en el sistema gastrointestinal, estar presente en una cantidad considerable (al menos  $1 \times 10^7$  UFC/mL o g del alimento ), resistir las condiciones gastrointestinales (pH y sales biliares) y la capacidad de adhesión al epitelio gastrointestinal.

El efecto benéfico de una bebida fermentada está relacionado con la presencia de las cepas probióticas viables, para tener un efecto inmunomodulatorio. Debido a que las cepas de la bebida fermentada estarán sometidas a concentraciones fisiológicas de diversos antineoplásicos es necesario evaluar su viabilidad en estas condiciones.

Con el fin de evaluar la tolerancia que presentan los probióticos hacia los fármacos se realizó la prueba de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de doxorubicina, metotrexato y paclitaxel sobre *Lactobacillus casei* R0215 y *Lactobacillus rhamnosus* R00111 50. Si la MIC resulta ser una concentración superior a las concentraciones estimadas del fármaco en plasma sanguíneo se puede asegurar que la cepa será tolerante durante la quimioterapia y con ello es factible su empleo en la elaboración de las bebidas fermentadas que permitan paliar y actuar como coadyuvante de la quimioterapia en pacientes de cáncer de mama.

### Susceptibilidad de *Lactobacillus casei* R0215 a doxorrubicina.

Usando el método de difusión de fármacos modificado por pozos en agar (figura 12), *Lactobacillus casei* R0215 fue sensible a concentraciones de 1 a 8 mg/mL de doxorrubicina, produciendo zonas de inhibición del rango de 1.3 - 2.1 cm. La concentración mínima inhibitoria fue por lo tanto de 1 mg/mL de doxorrubicina. Cabe mencionar que este dato de susceptibilidad de *Lactobacillus casei* R0215 a doxorrubicina es el primero que se obtiene ya que no existen documentos en la literatura que así lo reporten, e incluso los proveedores que comercializan la cepa carecen de esta información.

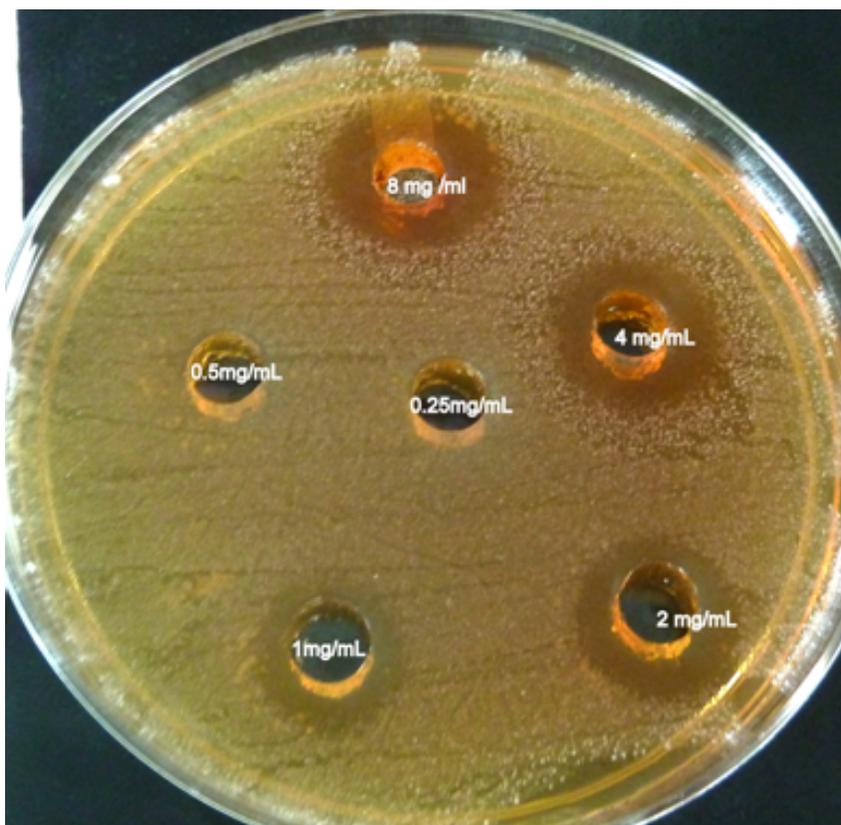


Fig. 12. Difusión en agar modificado con pozos, concentración mínima inhibitoria de doxorrubicina a una concentración de 1mg/mL sobre *Lactobacillus casei* R0215, tamaño de inóculo aprox.  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, 80  $\mu$ L de cada concentración, pozos 7 mm diámetro, 25 mL agar MRS.

La concentración mínima inhibitoria de doxorubicina sobre *Lactobacillus casei* R0215 fue de 1 mg /mL. Esta concentración es aproximadamente 100 000 veces mayor, comparada con la concentración superior de doxorubicina libre estimada en plasma ( $1.554 \times 10^{-5}$  mg/mL), por lo que se puede considerar que el probiótico, *Lactobacillus casei* R0215 es tolerante a concentraciones fisiológicas de doxorubicina cuando es empleado en sesiones de monoterapia, a dosis habituales.

El consumo de bebidas fermentadas con *Lactobacillus casei* R0215, durante monoterapia de doxorubicina es viable. Al no ser afectado el desarrollo de la cepa a concentraciones fisiológicas del fármaco, se garantiza un posible efecto benéfico en la salud, por parte del probiótico y su interacción con el epitelio gastrointestinal de huésped. Un requisito para obtener un efecto benéfico en la salud por consumo de probióticos, es que éstos estén viables durante su tránsito en el sistema gastrointestinal.

Tabla 10. Concentraciones de doxorubicina probadas para encontrar la concentración mínima inhibitoria sobre *Lactobacillus casei* R0215.

Concentraciones de doxorubicina. (mg/mL)	Repetición			Promedio (cm)	Desviación estándar
	A	B	C		
	Diámetro zona inhibición(cm)				
8	1.9	1.9	2.5	2.1	0.34
4	1.5	1.6	2.3	1.8	0.43
2	1.2	1.5	1.5	1.4	0.17
1	1.2	1.2	1.4	1.3	0.11
0.5	-	-	-		
0.25	-	-	-		
0.125	-	-	-		
$6.25 \times 10^{-2}$	-	-	-		
$3.12 \times 10^{-2}$	-	-	-		
$1.56 \times 10^{-2}$	-	-	-		
$7.81 \times 10^{-3}$	-	-	-		
$3.91 \times 10^{-3}$	-	-	-		
$1.95 \times 10^{-3}$	-	-	-		
$9.77 \times 10^{-4}$	-	-	-		
$4.88 \times 10^{-4}$	-	-	-		
$2.44 \times 10^{-4}$	-	-	-		
$1.22 \times 10^{-4}$	-	-	-		

(-) = sin halos de inhibición.

### Susceptibilidad de *Lactobacillus casei* R0215 a metotrexato.

Usando el método de difusión de fármacos modificado por pozos en agar (figura 13), *Lactobacillus casei* R0215 fue sensible a concentraciones de  $1.95 \times 10^{-3}$  a  $1.56 \times 10^{-2}$  mg/mL de metotrexato, produciendo zonas de inhibición del rango de 1.0 – 1.9 cm. La concentración mínima inhibitoria fue por lo tanto de  $1.95 \times 10^{-3}$  mg/mL de metotrexato.

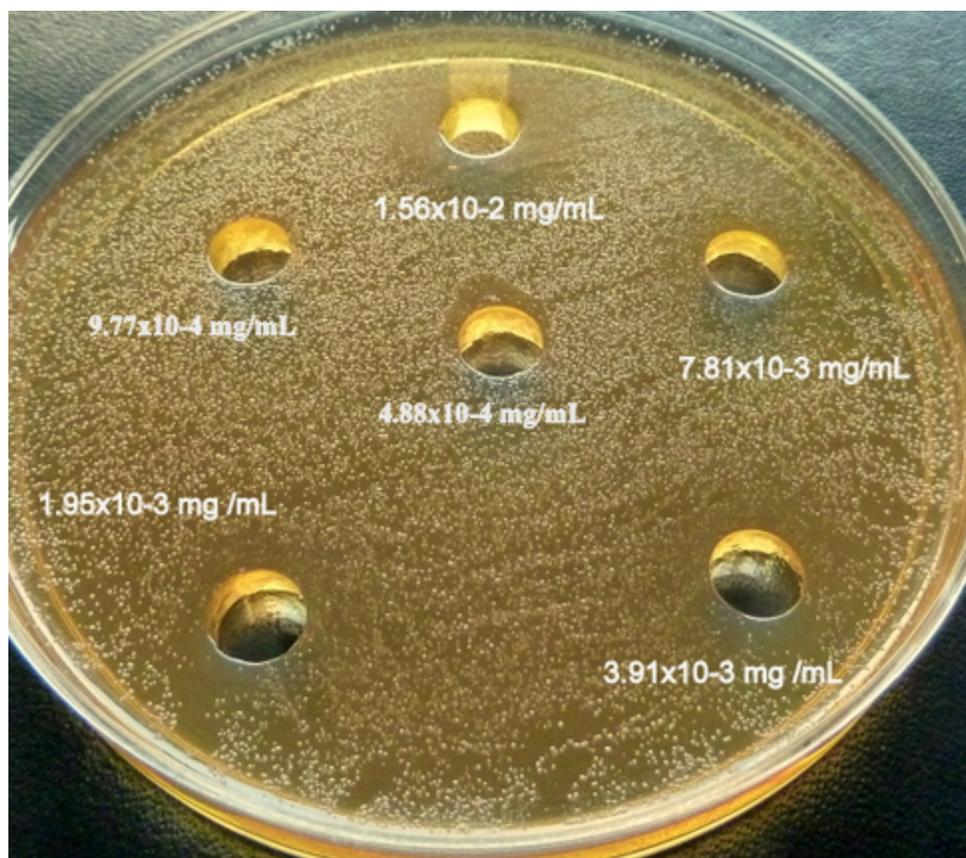


Figura 13. Difusión en agar modificado con pozos, concentración mínima inhibitoria de metotrexato de  $1.95 \times 10^{-3}$  mg/mL para *Lactobacillus casei* R0215, tamaño de inóculo aprox.  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, 80  $\mu$ L de cada concentración, pozos 7 mm diámetro, 25 mL agar MRS.

La concentración mínima inhibitoria de metotrexato sobre *Lactobacillus casei* R0215 fue de  $1.95 \times 10^{-3}$  mg /mL, que se encuentra sobre el rango de concentraciones del fármaco libre estimado en plasma ( $5.123 \times 10^{-4}$  –  $2.762 \times 10^{-3}$  mg/mL), por lo que se puede considerar que el probiótico, *Lactobacillus casei* R0215 es susceptible a concentraciones fisiológicas de metotrexato cuando es empleado en sesiones de monoterapia a dosis habituales.

La sensibilidad que presenta *Lactobacillus casei* R0215 al antineoplásico es bien conocida y mencionada en la literatura. El metotrexato forma parte de un grupo de drogas que inhiben la síntesis del ácido tetrahidrofólico que brinda grupos metilo, metileno o formilo necesarios durante la síntesis de bases púricas y pirimídicas tanto en células procariontas como eucariotas y por ello su efecto antibacteriano sobre bacterias Gram(+) y Gram (-). Por lo tanto el consumo de bebidas fermentadas con este probiótico no es viable durante regímenes de metotrexato, debido a que el efecto benéfico de un probiótico está relacionado a su viabilidad, la cual es afectada por este antineoplásico.

Tabla 11. Concentraciones de metotrexato probadas para encontrar la concentración mínima inhibitoria de este sobre *Lactobacillus casei* R0215.

Concentraciones de metotrexato. (mg/mL)	Repetición			Promedio (cm)	Desviación estándar
	A	B	C		
	Diámetro zona inhibición(cm)				
1	6.2	ND	ND		
0.5	4.5	ND	ND		
0.25	3.6	ND	ND		
0.125	3.3	ND	ND		
$6.25 \times 10^{-2}$	3.5	ND	ND		
$3.13 \times 10^{-2}$	2.2	ND	ND		
$1.56 \times 10^{-2}$	1.9	2.1	2.0	2	0.1
$7.81 \times 10^{-3}$	1.3	1.4	1.1	1.27	0.15
$3.91 \times 10^{-3}$	1.2	1.3	1.0	1.17	0.15
$1.95 \times 10^{-3}$	1	1.1	0.9	1.0	0.1
$9.77 \times 10^{-4}$	-	-	-		
$4.88 \times 10^{-4}$	-	-	-		

(-)= sin halos de inhibición

### Susceptibilidad de *Lactobacillus casei* R0215 a paclitaxel.

Usando el método de difusión de fármacos modificado por pozos en agar (figura 14), *Lactobacillus casei* R0215 fue sensible a concentraciones de 2.4 a 6 mg/mL de paclitaxel, produciendo zonas de inhibición del rango de 0.97 – 1.2 cm. La concentración mínima inhibitoria fue por lo tanto de 2.4 mg/mL de paclitaxel. Cabe mencionar también que este dato de susceptibilidad de *Lactobacillus casei* R0215 a paclitaxel es el primero que se reporta en la literatura, ya que no existen documentos que lo indiquen.

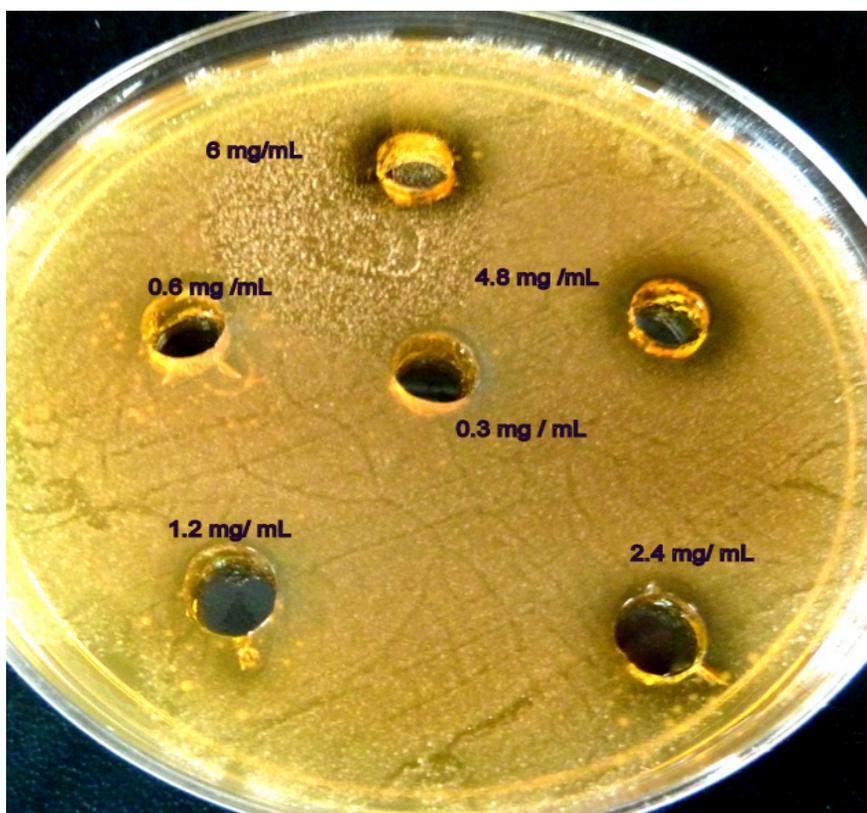


Fig. 14. Difusión en agar modificado con pozos, concentración mínima inhibitoria de paclitaxel de 2.4 mg/mL para *Lactobacillus casei* R0215, tamaño de inóculo aprox.  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, 80  $\mu$ L de cada concentración, pozos 7 mm diámetro, 25 mL agar MRS.

La concentración mínima inhibitoria de paclitaxel sobre *Lactobacillus casei R0215* se presentó en la concentración de 2.4 mg /mL. Que es aproximadamente 10 000 veces mayor comparada con la concentración superior de paclitaxel libre estimada en plasma ( $1.87 \times 10^{-4}$  mg/mL), por lo que se puede considerar que el probiótico, *Lactobacillus casei R0215* es tolerante a concentraciones fisiológicas de paclitaxel, cuando es empleado en sesiones de monoterapia, a dosis habituales. Por lo cual, el consumo de bebidas fermentadas, elaboradas con este probiótico es viable, ya que la cepa no será susceptible a paclitaxel y con ello se garantiza su posible efecto benéfico en la salud por su consumo.

Tabla 12. Concentraciones de paclitaxel probadas para encontrar la concentración mínima inhibitoria sobre *Lactobacillus casei R0215*.

Concentraciones de paclitaxel (mg/mL)	Repetición			Promedio (cm)	Desviación estándar
	A	B	C		
Diámetro zona inhibición(cm)					
6	1.1	1.3	1.2	1.2	0.1
4.8	1	1.1	1.1	1.1	0.06
2.4	0.9	1	1	0.97	0.06
1.2	-	-	-		
0.6	-	-	-		
0.3	-	-	-		
0.15	-	-	-		
$7.50 \times 10^{-2}$	-	-	-		
$3.75 \times 10^{-2}$	-	-	-		
$1.87 \times 10^{-2}$	-	-	-		
$9 \times 10^{-3}$	-	-	-		

(-)= sin halos de inhibición.

## Susceptibilidad de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 a doxorrubicina.

Usando el método de difusión de fármacos modificado por pozos en agar (figura 15), *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 fue sensible a concentraciones de 4 a 8 mg/mL de doxorrubicina, produciendo zonas de inhibición del rango de 2.5 – 2.7 cm. La concentración mínima inhibitoria fue por lo tanto de 4 mg/mL de doxorrubicina. Cabe mencionar también que este dato de susceptibilidad de *Lactobacillus rhamnosus* R0215 a doxorrubicina es el primero que se reporta en la literatura, ya que no existen documentos que lo indiquen.

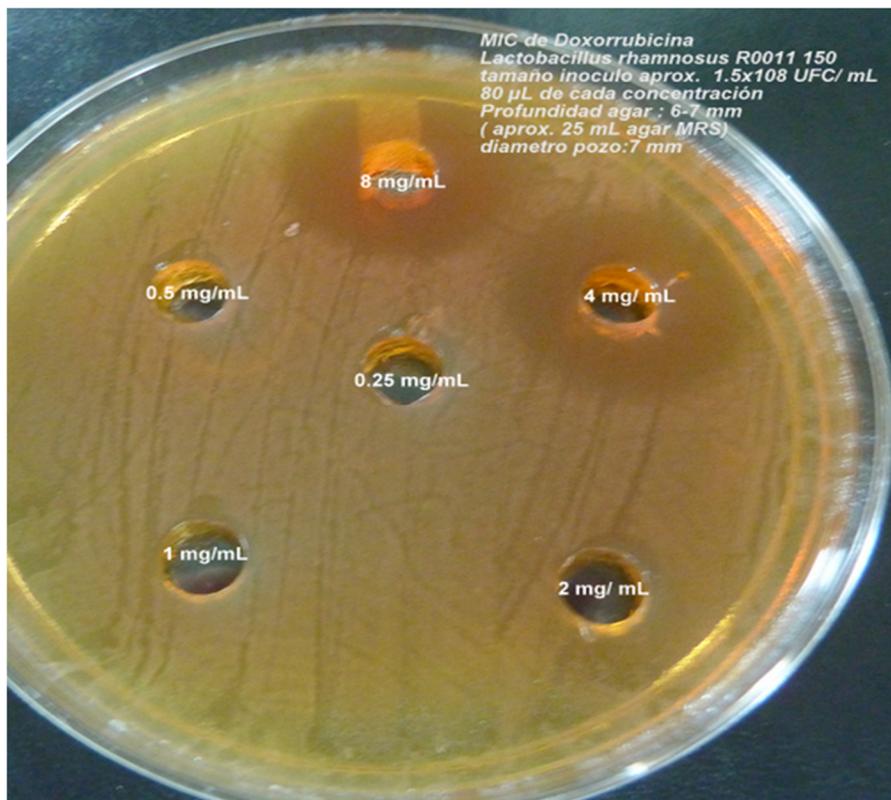


Fig. 15. Difusión en agar modificado con pozos, concentración mínima inhibitoria de doxorrubicina de 4 mg/mL para *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150, tamaño de inóculo aprox.  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, 80  $\mu$ L de cada concentración, pozos 7 mm diámetro, 25 mL agar MRS.

La concentración mínima inhibitoria de doxorrubicina sobre *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 fue de 4 mg /mL. Aproximadamente 100 000 veces mayor comparada con la concentración superior de doxorrubicina libre estimada en plasma ( $1.554 \times 10^{-5}$  mg/mL). Se puede considerar que el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 es tolerante a concentraciones fisiológicas de doxorrubicina cuando es empleado en sesiones de monoterapia, a dosis habituales. Entonces, el consumo de bebidas fermentadas con este probiótico es viable, ya que la cepa no será susceptible a doxorrubicina y con ello se garantiza su posible efecto benéfico en la salud por su consumo.

Tabla 13. Concentraciones de doxorrubicina probadas para encontrar la concentración mínima inhibitoria sobre *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150

Concentraciones de doxorrubicina. (mg/mL)	Repetición			Promedio (cm)	Desviación estándar
	A	B	C		
	Diámetro zona inhibición (cm)				
8	2.8	2.7	2.6	2.7	0.1
4	2.4	2.5	2.5	2.5	0.1
2	-	-	-		
1	-	-	-		
0.5	-	-	-		
0.25	-	-	-		
0.125	-	-	-		
$6.25 \times 10^{-2}$	-	-	-		
$3.12 \times 10^{-2}$	-	-	-		
$1.56 \times 10^{-2}$	-	-	-		
$7.81 \times 10^{-3}$	-	-	-		
$3.91 \times 10^{-3}$	-	-	-		
$1.95 \times 10^{-3}$	-	-	-		
$9.77 \times 10^{-4}$	-	-	-		
$4.88 \times 10^{-4}$	-	-	-		
$2.44 \times 10^{-4}$	-	-	-		
$1.22 \times 10^{-4}$	-	-	-		

(-)= sin halos de inhibición.

## Susceptibilidad de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 a metotrexato.

Usando el método de difusión de fármacos modificado por pozos en agar (figura 16), *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 fue sensible a concentraciones de  $7.63 \times 10^{-6}$  a  $1.53 \times 10^{-5}$  mg/mL de metotrexato, produciendo zonas de inhibición del rango de 2.1 – 2.57 cm. La concentración mínima inhibitoria fue por lo tanto de  $7.63 \times 10^{-6}$  mg/mL de metotrexato.

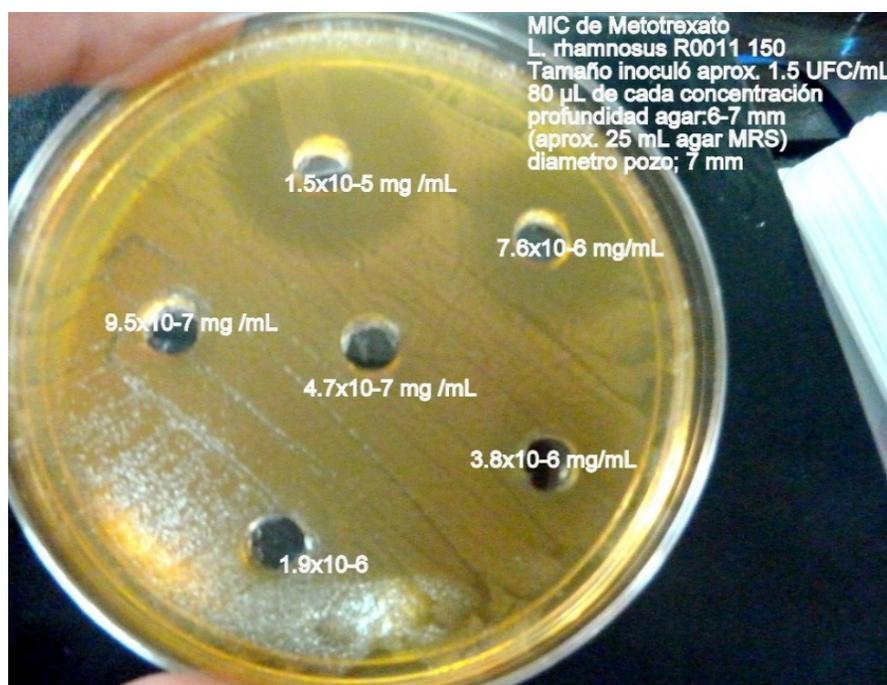


Fig. 16. Difusión en agar modificado con pozos, concentración mínima inhibitoria de metotrexato de  $7.63 \times 10^{-6}$  mg/mL para *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150, tamaño de inóculo aprox.  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, 80  $\mu$ L de cada concentración, pozos 7 mm diámetro, 25 mL agar MRS.

La mínima concentración inhibitoria de metotrexato sobre *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 se presentó a la concentración de  $7.63 \times 10^{-6}$  mg/mL, aproximadamente 100 veces menor por debajo del rango de concentraciones del fármaco libre estimado en plasma ( $5.123 \times 10^{-4}$  –

2.762x10<sup>-3</sup> mg/mL), por lo que la elaboración del alimento funcional, con este probiótico no es viable, ya que la cepa será susceptible a metotrexato.

Se sabía que metotrexato tiene un efecto bactericida sobre bacterias Gram + y Gram -, sin embargo no se sabía que cuál era la concentración mínima inhibitoria del metotrexato sobre esta cepa ácido láctica y mucho menos si la cepa resistirá a concentraciones plasmáticas de pacientes en quimioterapia con este antineoplásico.

Tabla 14. Concentraciones de metotrexato probadas para encontrar la concentración mínima inhibitoria sobre *Lactobacillus rhamnosus R0011 150*

Concentraciones de metotrexato (mg/mL)	Repetición			Promedio (cm)	Desviación estándar
	A	B	C		
1	6.6	ND	ND		
0.5	6.3	ND	ND		
0.25	6.3	ND	ND		
0.125	6.0	ND	ND		
6.25x10 <sup>-2</sup>	5.6	ND	ND		
3.13x10 <sup>-2</sup>	5	ND	ND		
1.56x10 <sup>-2</sup>	+, No se registró diámetro	ND	ND		
7.81x10 <sup>-3</sup>	+, No se registró diámetro	ND	ND		
3.91x10 <sup>-3</sup>	+, No se registró diámetro	ND	ND		
1.95x10 <sup>-3</sup>	+, No se registró diámetro	ND	ND		
9.77x10 <sup>-4</sup>	+, No se registró diámetro	ND	ND		
4.88x10 <sup>-4</sup>	+, No se registró diámetro	ND	ND		
2.44x10 <sup>-4</sup>	4	ND	ND		
1.22x10 <sup>-4</sup>	4	ND	ND		
6.10x10 <sup>-5</sup>	4	ND	ND		
3.05x10 <sup>-5</sup>	3	ND	ND		
1.53x10 <sup>-5</sup>	2.7	2.5	2.5	2.57	0.12
7.63x10 <sup>-6</sup>	2.2	2.0	2.1	2.1	0.12
3.81x10 <sup>-6</sup>	-	-	-		
1.91x10 <sup>-6</sup>	-	-	-		
9.53x10 <sup>-7</sup>	-	-	-		
4.77x10 <sup>-7</sup>	-	-	-		

ND: no se determinaron duplicados o triplicados, (-) = sin halos de inhibición

## Susceptibilidad de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 a Paclitaxel.

Usando el método de difusión de fármacos modificado por pozos en agar (figura 17), *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 fue sensible a concentraciones de 4.8 a 6 mg/mL de paclitaxel, produciendo zonas de inhibición del rango de 1.1 – 1.2 cm. La concentración mínima inhibitoria fue por lo tanto de 4.8 mg/mL de paclitaxel.

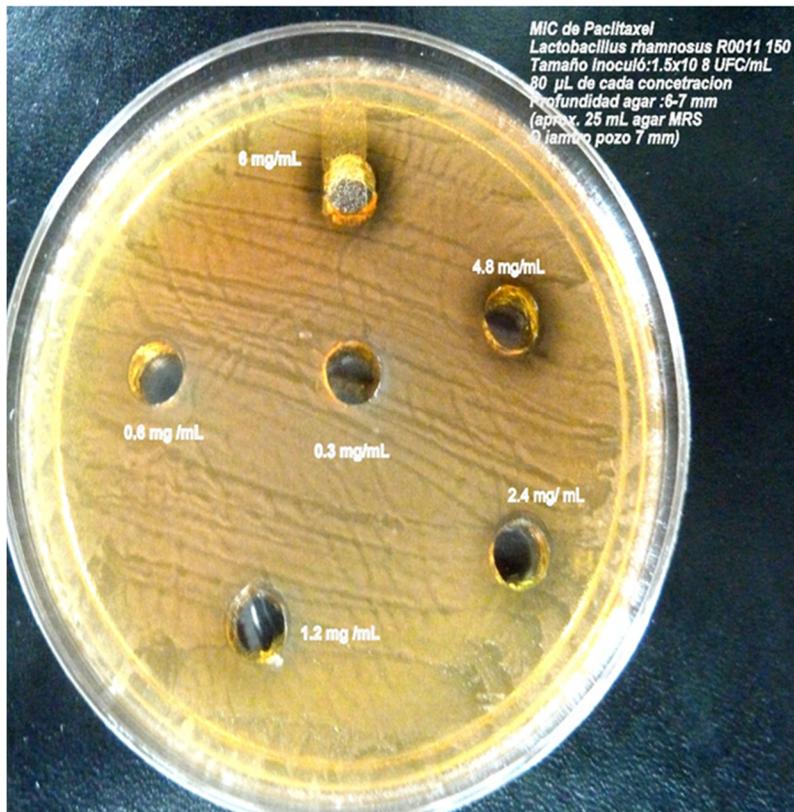


Fig. 17. Difusión en agar modificado con pozos, concentración mínima inhibitoria de paclitaxel de 4.8 mg/mL para *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150, tamaño de inóculo aprox.  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, 80  $\mu$ L de cada concentración, pozos 7 mm diámetro, 25 mL agar MRS.

La concentración mínima inhibitoria de paclitaxel sobre *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 se presentó a la concentración de 4.8 mg /mL, aproximadamente 10,000 veces mayor comparada con la concentración

superior de paclitaxel libre estimada en plasma ( $1.87 \times 10^{-4}$  mg/mL), por lo que se puede considerar que el probiótico *Lactobacillus rhamnosus R0011 150* es tolerante a concentraciones fisiológicas de paclitaxel cuando se aplica en sesiones de monoterapia a dosis habituales. Una bebida fermentada elaborada con este probiótico es factible, ya que la cepa no será susceptible a paclitaxel y con ello se garantiza su posible efecto benéfico en la salud por su consumo.

Tabla 15. Concentraciones de paclitaxel probadas para encontrar la concentración mínima inhibitoria sobre *Lactobacillus rhamnosus R0011 150*

Concentraciones de paclitaxel. (mg/mL)	Repetición			Promedio (cm)	Desviación estándar
	A	B	C		
	Diámetro zona inhibición (cm)				
6	1.2	1.2	1.2	1.2	0
4.8	1.1	1.1	1.1	1.1	0
2.4	-	-	-		
1.2	-	-	-		
0.6	-	-	-		
0.3	-	-	-		
0.15	-	-	-		
$7.50 \times 10^{-2}$	-	-	-		
$3.75 \times 10^{-2}$	-	-	-		
$1.87 \times 10^{-2}$	-	-	-		
$9 \times 10^{-3}$	-	-	-		

(-) = sin halos de inhibición.

## Capítulo VI.

### 6.1 Conclusiones

- Los medios de cultivo empleados, leche Svelty y bebida de amaranto, permiten un adecuado crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 y *Lactobacillus casei* R0215, comparado con el obtenido en caldo MRS en ambas cepas. Las poblaciones se incrementaron 100 veces (UFC/mL) a partir del nivel obtenido tras la inoculación.
- Un tamaño de inóculo de  $10^7$  UFC/mL al inicio de las fermentaciones, permitió alcanzar los niveles mínimos recomendados para denominar a las bebidas fermentadas como alimentos funcionales.
- El desarrollo máximo de ambas cepas alcanzó un rango de  $10^9$  -  $10^{10}$  UFC/mL en ambos medios de propagación permitiendo denominar a los productos fermentados como un "Producto con cultivos vivos y activos" según la National Yogurt Association (NYA) con sede en Estados Unidos.
- Los medios fermentados no presentaron aromas y colores desagradables durante el desarrollo de las cepas probióticas.
- La bebida de amaranto es el medio idóneo para desarrollo de las bebidas fermentadas ya que permite el desarrollo de ambas cepas en un número de microorganismos adecuado y similar al desarrollado en la leche Svelty; es un medio de crecimiento que no presentó precipitación de proteínas por disminución de pH y por ello presenta un medio homogéneo durante el crecimiento de las cepas; además de ser un alimento que no es retirado durante la quimioterapia en base a criterios de los oncólogos.

- La MIC de doxorubicina para *Lactobacillus casei* R0215 fue de 1 mg/mL, mientras que para de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 fue de 4 mg/mL.
- La MIC de paclitaxel para *Lactobacillus casei* R0215 fue de 2.4 mg/mL, para de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 fue de 4.8 mg/mL.
- La MIC de metotrexato para *Lactobacillus casei* R0215 fue de  $1.9 \times 10^{-3}$  mg/mL y para de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 fue de  $7.63 \times 10^{-6}$  mg/mL.
- El empleo de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 y *Lactobacillus casei* R0215 en bebidas fermentadas con fines coadyuvantes o paliativos es viable durante la administración de doxorubicina y paclitaxel, debido a que las cepas no son susceptibles a las concentraciones de sus fracciones libres en plasma sanguíneo.
- El empleo de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 y *Lactobacillus casei* R0215 en bebidas fermentadas con fines coadyuvantes o paliativos no es viable durante la administración de metotrexato, debido a que las cepas son altamente susceptibles a las concentraciones de sus fracciones libres en plasma sanguíneo.

## 6.2 Perspectivas

- Evaluar el resto de los antineoplásicos utilizados en las combinaciones comunes en quimioterapia en contra de cáncer de mama a concentraciones fisiológicas
- Evaluar el efecto inhibitorio que tienen diversas combinaciones de antineoplásicos sobre las cepas probióticas a concentraciones fisiológicas.
- Determinar la viabilidad de las cepas probióticas en condiciones de refrigeración o en su caso determinar las condiciones de almacenamiento adecuadas del probiótico.
- Realizar las pruebas inmunoestimuladoras que permitan determinar los efectos paliativos o coadyuvantes que realmente tienen estas cepas en pacientes de cáncer de mama.

## Capítulo VII.

### Bibliografía

1. Abd El-Attis, Wasicek, K., Mark, S., Hegazi, R., 2009. Use of probiotics in the management of chemotherapy induced diarrhea: a case study. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 33(5), pp. 569-570.
2. American cancer society, 2008. Global Cancer Facts y Figures 2nd Edition. (En línea) Disponible en: <http://www.cancer.org/research/cancerfactsfigures/globalcancerfactsfigures/global-facts-figures-2nd-ed>[Consultado 26 febrero 2013]
3. Brandtzaeg P y Pabst R, 2004. Let's go mucosal: communication on slippery ground. Trends Immunol 25, pp.570–577.
4. Camacho, A, Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, L., Velázquez, O., 2007. Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. Ciudad de México: Facultad de Química. UNAM.
5. CANAIVE, 2013. ¿Cuánto mide México? En los medios, 2013(En línea)Disponible en: <http://www.canaive.org.mx/antrop6.php> [Consultado 10 abril 2013].
6. Marín, M., Laviano, A., Pichard, C., Gómez C., 2007. Relación entre la intervención nutricional y la calidad de vida en el paciente con cancer. Nutr Hosp. 22(3).
7. Cavalieri, S., et al., 2005. Manual of antimicrobial susceptibility Testing. American Society for Microbiology. Washington. Departments of Laboratory Medicine and Microbiology University of Washington Seattle.

8. Christine M., Harris y Douglas B., 1984. The estimation of microbial biomass, Department of Botany and Microbiology, University College of Wales .Biosensor, 1, pp.17-84.
9. Chuang, L., Wu, KG., Pai, C., Hsieh, PS, Tsai JJ, Yen, JH. , 2007. Heat killed cells of lactobacilli skew the immune response toward T helper 1 polarization in mouse splenocytes y dendritic cell-treated T cells. J Agric Food Chem. 55(26), pp.11080-11086.
10. Dahl, T. A., Midden, W. R., y Hartman, P. E., 1989.Comparison of killing of Gram-negative y Gram-positive bacteria by pure singletoxygen. J. Bacteriol, 171, pp. 2188-2194
11. Danesi, R., Fogli, S., Gennari, A., Conte, P., Del Tacca, M., 2002. Pharmacokinetics pharmacodynamic relationships of the antracycline anticancer drugs. Clin Pharmacokinet, 41, pp.431-444.
12. De la Vara, E., Suárez, L., Ángeles, A., Torres, G., Lazcano, E., 2011. Tendencias de la mortalidad por cáncer de mama en México. Salud Pública Méx. , 53, pp. 385-393. De Moreno de LeBlanc, A., Maldonado, C., Chaves, S., 2005.Oral administration of Lactobacillus casei CRL 431 increases immunity in bronchus y mammary glands. Eur J Inflamm 3, pp. 23–28.
13. De Moreno de LeBlanc A, Matar C, LeBlanc N., 2005.Effects of milk fermented by Lactobacillus helveticus R389 on a murine breast cancer model. Breast Cancer Res 7, pp. 477–448.
14. De Moreno de LeBlanc, A., Perdigon, G., 2005. Reduction of beta glucuronidase y nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model. Biocell, 29, pp. 15–24.

15. Duncan M, Grant G., 2003. Oral y intestinal Mucositis causes y possible treatments. *Aliment Pharmacol Ther.*, 18, pp. 853-874.
16. Easo, J., Measham, J., Munroe, J., Green-Johnson J., 2002. Immunostimulatory actions of lactobacilli: mitogenic induction of antibody production y spleen cell proliferation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*. *Food Agric Immunol.* , 14(1), pp. 73–83.
17. Escudero-Ortiz, V., et al. 2011. Farmacocinética poblacional de doxorubicina aplicada a la personalización de su dosificación en pacientes oncológicos. *Farm Hosp.* , 36(4).
18. FAO, 2006. Probióticos en los alimentos, propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Estudio FAO alimentación y nutrición*, 85
19. FAO/WHO, 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations y World Health Organization Expert Consultation Report.
20. Galdeano, CM. Perdigon, G., 2006. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vaccine Immunol.* , 13(2), pp. 219–26.
21. Gewirtz, DA., 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin y daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, 57, pp. 727-741.

22. Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutrit*, 125, pp. 1401–1412.
23. Gonzáles, F., Gonzáles, B., 2006. Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolémicos. *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición*. 7 (1).
24. González, J., 2009. Estudio de la encapsulación de *Bifidobacterium animalis* sbsp. *lactis* y su uso como probiótico. Tesis Doctorado en ciencias con Especialidad Alimentos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN.
25. Guarner, F., Khan, AG., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis, J., Lemair, T., Kaufmann, P., de Paula, JA., Fedorak, R., Shanahan, F., Sanders, ME., Szajewska, H., Ramakrishna, BS., Karakan, T., Kim, N., 2001. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics y prebiotics October 2012. *J Clin Gastroent*, 46(6),pp. 468-481
26. Guarner, F., y Schaafsma, G. J., 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39, pp. 237–238.
27. IMSS, 2011. Prevención, Tamizaje y Referencia Oportuna de Casos Sospechosos de Cáncer de Mama en el Primer Nivel de Atención. México: PDF Instituto Mexicano del Seguro Social.
28. Institut Rosell, 2002, Institut Rosell's probiotic strains, pdf, Disponible en:  
[http://www.probacti.de/files/11\\_Institut%20Rosells%20probiotic%20strains%20DOWNLOAD.pdf](http://www.probacti.de/files/11_Institut%20Rosells%20probiotic%20strains%20DOWNLOAD.pdf)(Consultado 16 mayo 2013)

29. Jorgensen, J., Ferraro, M., 2012. Antimicrobial Susceptibility Testing: General Principles y Contemporary Practices. The University of Texas Health Science Center, 26, pp. 973-980.
30. Kanasaki, M., Breheny. S., et al., 1975, Effect of temperatura on the growth y acid producción of lactic acid bacteria. Austral J Dairy Technol, 30(4), pp. 142-144.
31. Knaul, FM., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola, H., Langer, A., Frenk, J., 2009. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. Salud Publica Méx., 51(2), pp. 335-344.
32. Keefe, DM., Gibson, RJ., Hauer Jensen M., 2004. Gastrointestinal mucositis. Semin Oncol Nurs., 20, pp. 38-47.
33. Kong, S. y Davison, A. J., 1980. The role of interactions between O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH, e<sup>-</sup> y O<sub>2</sub><sup>-</sup> in free radical damage to biological systems, Arch. Biochem. Biophys., 204, pp. 13-29.
34. LeBlanc JG, Matar, C., Valdez JC et al., 2002. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. J Dairy Sci 85, 2733-2742.
35. Lilley, D. M. y Stillwell, R. H., 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. Science, 147, pp. 747-748.
36. Lourens-Hattingh, A. y BC Viljoen, 2001. Yogurt as probiotic carrier food. Internat Dairy J, 11 (1-2), pp.1-17.

37. Maassen, C., van Holten-Neelen, C., Balk, F., Heijne den Bak-Glashouwer, MJ., Leer, RJ., Laman, JD., 2000. Strain dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered lactobacillus strains. *Vaccine*, 18(23), pp. 2613–2623.
38. Maeda, H., Shiraishi, A. 1996. TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct y IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J Immunol.*, 156(1), pp. 73.
39. Maroof, H., Mohammad, Z., Mohabati A., Azimi M., 2012. Lactobacillus acidophilus Could Modulate the Immune Response Against Breast Cancer in Murine Model. *J Clin Immunol.*, 32(6), pp. 1353-1359.
40. Massagué, J. 2008, .TGF [beta] in cancer. *Cell*, 134(2), pp.215–230.
41. Mendoza, N, 2008. Farmacocinética integral: principios y conceptos. farmacología médica. Ciudad de México, Editorial Médica Panamericana, pp.111-121.
42. Miller, A., Elamin, E., 2009. Use of probiotics for treatment of chemotherapy induced diarrhea: Is it a Myth? *JPEN*, 33(5), pp. 573-574.
43. Murosaki, S., Muroyama, K., Yamamoto, Y., Yoshikai, Y., 2000. Antitumor effect of heat killed Lactobacillus plantarum L-137 through restoration of impaired interleukin-12 production in tumor bearing mice. *Canc Immunol Immunother*, 49(3), pp. 157–164.
44. Muller, I., Niethammer, D., Bruchelt, G., 1998. Anthracycline derived chemotherapeutics in apoptosis y free radical cytotoxicity. *Int JMol Med.*, 1, pp. 491.

45. National Cancer Institute, 2001. Cómplices en la mirilla: las células inmunitarias que ayudan a los tumores son el blanco del ataque. (En línea) Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/noticias/boletin/101111/page13> [Consultado 2 marzo 2013].
46. Naidu, AS., Bidlack, W. y Clemens, R., 1999. Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB), *Critical Reviews in Food Science y Nutrition*, 39:1, pp. 13-126.
47. Organización Mundial de la Salud, 2013. Nota descriptiva No, 297: Cáncer (en línea) (Actualizado enero 2013) Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> [Consultado 26 febrero 2013]
48. Österlund, P., Ruotsalainen, T., Korpela, R., et al., 2007. Lactobacillus supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: a randomised study. *Br J Cancer*, 97, pp. 1028-1030.
49. Pereira, A., Maciel, T., Rodrigues, S., 2010. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Res Internat* ,44(5), pp. 1276–1280.
50. Prado F., Parada J., Pandey A., Soccol C., 2008. Trends in nondairy probiotic beverages. *Food Res Internat* 41, pp.111–123.
51. Prescott, S., Wickens, K., Westcott, L., Jung, W, Currie, H., Black, P., et al., 2008. Supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* or *Bifidobacterium lactis* probiotics in pregnancy increases cord blood interferon  $\gamma$  and breast milk transforming growth factor- $\beta$  and immunoglobulin A detection. *Clin Exp Allergy*. 38(10), pp.1606–1614

52. Rachid, M., Matar, C., Duarte, J., Perdigon, G., 2006. Effect of milk fermented with *Lactobacillus helveticus* R389(+) proteolytic strain on the immune system and on the growth of 4T1 breast cancer cell in mice. Department of Chemistry and Biochemistry, Université de Moncton, Moncton, NB, Canada, 47(2), pp. 242-253.
53. Ramírez, R., Luna, B., Mejía, A., Velázquez, O., Tsuzuki, G., Vierna, L., Hernández, L., Muggenburg, I.; Camacho, A., Urzúa, M., 2006. Manual de prácticas de microbiología general. Quinta edición. Ciudad de México, Facultad de Química. UNAM
54. Reed MJ y Purohit A., 1997. Breast cancer y the role of cytokines in regulating estrogen synthesis: an emerging hypothesis. *Endocr Rev.*, 18, pp. 701–715.
55. Rojas, J., García, A., López., 2005. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 4 (2), pp.28-30.
56. Roos, N., Katam, M., 2011. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998-3. *Am J Clin Nutr.*, 71, pp.405–411.
57. Sacco, J., Botten, J., Macbeth, F., Bagust, A., Clark, P., 2010. The Average Body Surface Area of Adult Cancer Patients in the UK: A Multicentre Retrospective Study. *PLoS ONE*, 5(1).
58. Sánchez, L., Vichi, J, Llanes, M., Castro, E., Soler, D., Espinosa, I., Kociubinski, G., Ferreira, C., 2011. Aislamiento y caracterización in vitro de cepas de *Lactobacillus* spp. Como candidato a probióticas. *Rev. Salud Anim.*, 33(3), pp. 154-160.

59. Secretaria de salud. NOM-051-SCF1/SSA1-2010-1994. Especificaciones generales de etiquetas para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados información comercial y sanitaria. Norma Oficial Mexicana. México.
60. Secretaria de salud. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de Bacterias aerobias en placa. Norma Oficial Mexicana. México.
61. Secretaria de salud. NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Norma Oficial Mexicana. México.
62. Sistema nacional de información en salud (SINAIS), 2008. Mortalidad Información 2000-2008. (En línea) Disponible en: [http://sinais.salud.gob.mx/descargas/xls/m\\_011.xls](http://sinais.salud.gob.mx/descargas/xls/m_011.xls)[Consultado 26 febrero 2013].
63. Sociedad Española de Farmacéuticos de Hospital .2006. Medicamentos citostáticos, Ed electrónica.
64. Takagi A, Matsuzaki T, Sato M, Nomoto K, Morotomi M, Yokokura T., 2001. Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by a probiotic microorganism. *Carcinogenesis*, 22(4):pp. 599.
65. Wallace, TD. Bradley, S., Buckley, ND., Green-Johnson, JM., 2003. Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. *J Food Protect*, 66(3), pp. 466–72
66. Yazdi, MH., Dallal, MMS., Hassan, ZM., Holakuyee, M., Amiri SA, Abolhassani M, et al., 2001. Oral administration of lactobacillus acidophilus induces IL-12 production in spleen cell culture of BALB/c mice bearing transplanted breast tumour. *Br J Nutr*. 2010; 104(2):227–32.

67. Willey J., 2002. Prescott's Microbiology, 5, McGraw-Hill Education.

## Capítulo VIII. Apéndices

### 8.1 Tablas de resultados del crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 en diferentes medios de cultivo.

Resultados conteo en placa, UFC/mL *Lactobacillus casei* R0215 en caldo MRS y pH.

Tabla 16. Resultados conteo en placa, UFC/mL <i>Lactobacillus casei</i> R0215 en caldo MRS y pH.								
Tiempo (horas)	Serie duplicado	Diluciones				pH	pH promedio	UFC/mL caldo MRS
		10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>			
0	A	29	1			ND	ND	30x10 <sup>6</sup>
	B	31	2			ND		
3	A	50	1			ND	ND	52x10 <sup>6</sup>
	B	54	5			ND		
6	A	>250	57	9		ND	ND	51x10 <sup>7</sup>
	B	>250	45	12		ND		
9	A		264	49	1	ND	ND	45x10 <sup>8</sup>
	B		268	41	9	ND		
14	A	>250	178	74	9	ND	ND	47x10 <sup>8</sup>
	B	>250	123	82	7	ND		
17	A		>250	158	24	ND	ND	21x10 <sup>9</sup>
	B		>250	182	25	ND		
20	A		>250	100	11	ND	ND	13x10 <sup>9</sup>
	B		>250	158	13	ND		
23	A		>250	144	23	ND	ND	12x10 <sup>9</sup>
	B		>250	96	13	ND		

ND= no se determinó. Las cifras sombreadas en gris, son las que se consideran adecuadas para realizar los cálculos de cuenta en placa, utilizando ensayos por duplicado, seleccionando rango de sensibilidad para mesófilos aerobios: 25 a 250 colonias.

Tablas de resultados de cinética crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 en caldo MRS por espectrofotometría.

**Tabla 17. Cinética del crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 en caldo MRS, por espectrofotometría a 480 nm.**

TIEMPO( Horas)	Serie repetición (Lecturas a 480 nm)		Promedio lecturas	Desviación Estándar
	A	B		
0	0.010	0.014	0.012	0.003
3	0.015	0.023	0.019	0.006
6	0.049	0.045	0.047	0.003
9	0.142	0.169	0.156	0.019
14	0.311	0.385	0.348	0.052
17	0.358	0.435	0.397	0.054
20	0.712	0.731	0.722	0.013
23	0.716	0.768	0.742	0.037

**Tabla 18. Cinética del crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 en caldo MRS, por espectrofotometría a 600 nm.**

Tiempo ( Horas)	Serie repetición (Lecturas a 600 nm)		Promedio lecturas	Desviación estándar
	A	B		
0	0.001	0.002	0.002	0.001
3	0.006	0.005	0.006	0.001
6	0.003	0.002	0.003	0.001
9	0.118	0.112	0.115	0.004
14	0.260	0.390	0.325	0.092
17	0.435	0.560	0.498	0.088
20	0.569	0.592	0.581	0.016
23	0.768	0.614	0.691	0.109

Resultados conteo en placa, UFC/mL *Lactobacillus casei* R0215 en leche Svelty y pH.

Tabla 19. Resultados conteo en placa, UFC <i>Lactobacillus casei</i> R0215/mL en leche Svelty y pH.								
Tiempo (horas)	Serie triplicado	Diluciones				pH	pH promedio	UFC/mL de leche Svelty
		10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>			
0	A	19	1			6	6	17x10 <sup>6</sup> Valor estimado
	B	14	2			6		
	C	17	1			6		
3	A	19	1			6	6	23x10 <sup>6</sup>
	B	21	2			6		
	C	25	3			6		
6	A	170	54	2		6	6	37x10 <sup>7</sup>
	B	251	50	1		6		
	C	250	52	8		6		
9	A		194	58	10	6	6	18x10 <sup>8</sup>
	B		155	16	6	6		
	C		184	15	6	6		
14	A	>250	128			5	5	10x10 <sup>8</sup>
	B	>250	82			5		
	C	>250	116			5		
17	A	>250	141	15		5	5	13x10 <sup>8</sup>
	B	>250	111	10		5		
	C	>250	147	11		5		
20	A	>250	129	37		5	5	27x10 <sup>8</sup>
	B	>250	126	54		5		
	C	>250	152	29		5		
23	A	>250	145	54		5	5	29x10 <sup>8</sup>
	B	>250	225	37		5		
	C	>250	152	33		5		

Las cifras sombreadas en gris, son las que se consideran adecuadas para realizar los cálculos de cuenta en placa, utilizando ensayos por triplicado, seleccionando rango de sensibilidad para mesófilos aerobios: 25 a 250 colonias.

Tablas de resultados de cinética crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 en leche Svelty por espectrofotometría.

**Tabla 20. Cinética del crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 en leche Svelty, por espectrofotómetro a 480 nm de longitud de onda.**

TIEMPO ( Horas)	Serie repetición (Lecturas a 480 nm)			Promedio lecturas	Desviación estándar
	A	B	C		
0	0.369	0.460	0.419	0.416	0.046
3	0.398	0.489	0.520	0.469	0.063
6	0.454	0.537	0.571	0.521	0.060
9	0.441	0.550	0.554	0.515	0.064
14	0.558	0.600	0.610	0.589	0.028
17	0.645	0.659	0.633	0.646	0.013
20	0.638	0.640	0.738	0.672	0.057
23	0.722	0.727	0.727	0.725	0.003

**Tabla 21. Cinética del crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 en leche Svelty, por espectrofotómetro a 600 nm de longitud de onda.**

Tiempo ( Horas)	Serie repetición (Lecturas a 600 nm)			Promedio lecturas	Desviación Estándar
	A	B	C		
0	0.207	0.284	0.244	0.245	0.039
3	0.213	0.295	0.316	0.275	0.054
6	0.257	0.332	0.358	0.316	0.052
9	0.258	0.342	0.343	0.314	0.049
14	0.320	0.380	0.379	0.360	0.034
17	0.441	0.431	0.408	0.427	0.017
20	0.397	0.412	0.490	0.433	0.050
23	0.483	0.483	0.499	0.488	0.009

Resultados conteo en placa, UFC/mL *Lactobacillus casei* R0215 en bebida de amaranto y pH.

Tabla 22. Resultados conteo en placa, UFC <i>Lactobacillus casei</i> R0215/mL bebida de amaranto y pH.								
Tiempo (horas)	Serie duplicado	Diluciones				pH	pH promedio	UFC/mL bebida de amaranto
		10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>			
0	A	22	2			6	6	31x10 <sup>6</sup>
	B	21	2			6		
	C	40	5			6		
3	A	24	11			5	5	24x10 <sup>6</sup>
	B	80	3			5		
	C	42	6			5		
6	A	259	61			5	5	32x10 <sup>7</sup>
	B	140	24			5		
	C	341	59			5		
9	A	>250	123	8		5	5	12x10 <sup>8</sup>
	B	>250	108	9		5		
	C	>250	137	10		5		
14	A	>250	125	30		4	4	23x10 <sup>8</sup>
	B	>250	166	26		4		
	C	>250	191	35		4		
17	A	>250	174	19		4	4	23x10 <sup>8</sup>
	B	>250	134	30		4		
	C	>250	164	39		4		
20	A	>250	180	29	9	3	3	33x10 <sup>8</sup>
	B	>250	179	48		3		
	C	>250	190	64		3		
23	A	>250	216	36		4	3	32x10 <sup>8</sup>
	B	>250	180	29		4		
		>250	179	69		4		

Las cifras sombreadas en gris, son las que se consideran adecuadas para realizar los cálculos de cuenta en placa, utilizando ensayos por triplicado, seleccionando rango de sensibilidad para mesófilos aerobios: 25 a 250 colonias.

Tablas de resultados de cinética crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 en bebida de amaranto por espectrofotometría.

**Tabla 23. Cinética del crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 en bebida de amaranto, por espectrofotómetro a 480 nm de longitud de onda.**

Tiempo (Horas)	Serie repetición (Lecturas a 480 nm)			Promedio lecturas	Desviación estándar
	A	B	C		
0	1.116	1.126	1.115	1.119	0.006
3	1.100	1.148	1.143	1.130	0.026
6	1.129	1.119	1.202	1.150	0.045
9	1.143	1.189	1.143	1.158	0.027
14	1.219	1.261	1.213	1.231	0.026
17	1.219	1.254	1.253	1.242	0.020
20	1.139	1.157	1.196	1.164	0.029
23	1.201	1.192	1.227	1.207	0.018

**Tabla 24. Cinética del crecimiento de *Lactobacillus casei* R0215 en bebida de amaranto, por espectrofotómetro a 600 nm de longitud de onda.**

Tiempo (Horas)	Serie repetición (Lecturas a 600 nm)			Promedio lecturas	Desviación estándar
	A	B	C		
0	0.857	0.878	0.875	0.870	0.011
3	0.841	0.890	0.884	0.872	0.027
6	0.838	0.850	0.930	0.873	0.050
9	0.833	0.819	0.867	0.840	0.025
14	0.937	0.948	0.944	0.943	0.006
17	1.049	1.011	1.081	1.047	0.035
20	0.941	0.916	0.884	0.914	0.029
23	0.975	0.997	0.976	0.983	0.012

## 8.2 Tablas de resultados del crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en diferentes medios de cultivo.

Resultados conteo en placa, UFC/mL *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en caldo MRS y pH.

Tabla 25. Resultados conteo en placa, UFC <i>L. rhamnosus</i> R0011 150 /mL caldo MRS y pH.								
Tiempo (horas)	Serie duplicado	Diluciones				pH	pH promedio	UFC/mL caldo MRS
		10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>			
0	A	29	1			ND	ND	23x10 <sup>6</sup>
	B	16	1			ND		
3	A	51	3			ND	ND	52x10 <sup>6</sup>
	B	52	3			ND		
6	A	265	37	8		ND	ND	37x10 <sup>7</sup>
	B	257	36	4		ND		
9	A	>250	200	39	5	ND	ND	30x10 <sup>8</sup>
	B	>250	224	34	2	ND		
14	A		>250	117	21	ND	ND	12x10 <sup>9</sup>
	B		>250	114	16	ND		
17	A		>250	265	57	ND	ND	54x10 <sup>9</sup>
	B		>250	280	51	ND		
20	A		>250	201	35	ND	ND	21x10 <sup>9</sup>
	B		>250	197	28	ND		
23	A		>250	187	30	ND	ND	21x10 <sup>9</sup>
	B		>250	139	20	ND		

ND= no se determinó

Las cifras sombreadas en gris, son las que se consideran adecuadas para realizar los cálculos de cuenta en placa, utilizando ensayos por duplicado, seleccionando rango de sensibilidad para mesófilos aerobios: 25 a 250 colonias.

Tablas de resultados de cinética crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* R011 150 en caldo MRS por espectrofotometría.

**Tabla 26. Cinética del crecimiento de *L. rhamnosus* R0011 150 en caldo MRS, por espectrofotómetro a 480 nm.**

Tiempo ( horas)	Serie repetición (Lecturas a 480 nm)		Promedio lecturas	Desviación estándar
	A	B		
0	0.006	0.006	0.006	0.000
3	0.041	0.037	0.039	0.003
6	0.053	0.050	0.052	0.002
9	0.113	0.126	0.120	0.009
14	0.353	0.371	0.362	0.013
17	0.687	0.679	0.683	0.006
20	0.733	0.736	0.735	0.002
23	0.775	0.722	0.749	0.037

**Tabla 27 .Cinética del crecimiento de *L. rhamnosus* R0011 150 en caldo MRS, por espectrofotómetro a 600 nm**

Tiempo ( horas)	Serie repetición (Lecturas a 600 nm)		Promedio lecturas	Desviación estándar
	A	B		
0	0.030	0.025	0.028	0.004
3	0.007	0.007	0.007	0.000
6	0.037	0.020	0.029	0.012
9	0.069	0.074	0.072	0.004
14	0.262	0.284	0.273	0.016
17	0.534	0.503	0.519	0.022
20	0.590	0.571	0.581	0.013
23	0.559	0.567	0.563	0.006

Resultados conteo en placa, UFC/mL *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en leche Svelty y pH.

Tiempo (Horas)	Serie triplicado	Diluciones				pH	pH promedio	UFC/mL leche Svelty
		10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>			
0	A	16	1			6	6	21X10 <sup>6</sup>
	B	24	2			6		
	C	18	2			6		
3	A	19	5			6	6	25X10 <sup>6</sup>
	B	29	2			6		
	C	20	3			6		
6	A	231	25	1		6	6	22X10 <sup>7</sup>
	B	130	37	3		6		
	C	165	17	1		6		
9	A	>250	102	58	2	6	6	30X10 <sup>8</sup>
	B	>250	163	53	3	6		
	C	212	154	24	1	6		
14	A		>250	100	11	5	5	21X10 <sup>9</sup>
	B		>250	170	42	5		
	C		ND	ND	ND	5		
17	A		>250	127	10	5	5	12X10 <sup>8</sup>
	B		>250	103	14	5		
	C		ND	50	5	5		
20	A		ND	48	7	5	5	50X10 <sup>8</sup>
	B		ND	48	3	5		
	C		ND	53	5	5		
23	A		ND	47	5	5	5	48X10 <sup>8</sup>
	B		ND	48	4	5		
	C		ND	ND	ND	5		

ND= no se determinó.

Las cifras sombreadas en gris, son las que se consideran adecuadas para realizar los cálculos de cuenta en placa, utilizando ensayos por triplicado, seleccionando rango de sensibilidad para mesófilos aerobios: 25 a 250 colonias.

Tablas de resultados de cinética crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* R011 150 en leche Svelty por espectrofotometría.

**Tabla 29. Cinética del crecimiento de *L. rhamnosus* R0011 150 en leche Svelty , por espectrofotómetro a 480 nm**

Tiempo (Horas)	Serie repetición (Lecturas a 480 nm)			Promedio lecturas	Desviación estándar
	A	B	C		
0	0.500	0.496	0.500	0.499	0.002
3	0.451	0.478	0.447	0.459	0.017
6	0.471	0.466	0.467	0.468	0.003
9	0.485	0.448	0.449	0.461	0.021
14	0.521	0.529	0.523	0.524	0.004
17	0.556	0.498	0.528	0.527	0.029
20	0.716	0.708	0.629	0.684	0.048
23	0.625	0.652	0.580	0.619	0.036

**Tabla 30. Cinética del crecimiento de *L. rhamnosus* R0011 150 en leche Svelty , por espectrofotómetro a 600 nm**

Tiempo (Horas)	Serie repetición (Lecturas a 600 nm)			Promedio lecturas	Desviación estándar
	A	B	C		
0	0.316	0.313	0.313	0.314	0.002
3	0.285	0.278	0.277	0.280	0.004
6	0.292	0.291	0.283	0.289	0.005
9	0.303	0.271	0.272	0.282	0.018
14	0.382	0.317	0.334	0.344	0.034
17	0.328	0.282	0.301	0.304	0.023
20	0.483	0.423	0.418	0.441	0.036
23	0.419	0.424	0.377	0.407	0.026

Resultados conteo en placa, UFC/mL *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en bebida de amaranto y pH.

Tabla 31. Resultados conteo en placa, UFC <i>L. rhamnosus</i> R0011 150 /mL bebida de amaranto y pH								
Tiempo (horas)	Serie duplicado	Diluciones				pH	pH promedio	UFC/mL caldo MRS
		10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>			
0	A	19	1			6	6	16x10 <sup>6</sup> Valor estimado
	B	12	0			6		
	C	18	1			6		
3	A	19	7			5	5	17x10 <sup>6</sup> Valor estimado
	B	15	5			5		
	C	16	1			5		
6	A	36	6			5	5	44x10 <sup>7</sup>
	B	49	1			5		
	C	46	3			5		
9	A	154	31			5	5	13x10 <sup>7</sup>
	B	123	15			5		
	C	124	17			5		
14	A	>250	175	13		5	5	16x10 <sup>8</sup>
	B	>250	126	15		5		
	C	>250	168	18		5		
17	A	>250	197	30		3	3	23x10 <sup>8</sup>
	B	>250	155	25		3		
	C	>250	195	30		3		
20	A	>250	138	29		4	4	20x10 <sup>8</sup>
	B	>250	137	29		4		
	C	>250	110	21		4		
23	A	>250	111	12		4	4	20x10 <sup>8</sup>
	B	>250	144	44		4		
	C	>250	144	23		4		

Las cifras sombreadas en gris, son las que se consideran adecuadas para realizar los cálculos de cuenta en placa, utilizando ensayos por triplicado, seleccionando rango de sensibilidad para mesófilos aerobios: 25 a 250 colonias.

Tablas de resultados de cinética crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* R011 150 en bebida de amaranto por espectrofotometría.

**Tabla 32. Cinética del crecimiento de *L. rhamnosus* R0011 150 en leche Svelty , por espectrofotómetro a 480 nm**

Tiempo (Horas)	Serie repetición (Lecturas a 480 nm)			Promedio lecturas	Desviación estándar
	A	B	C		
0	1.235	1.230	1.233	1.233	0.003
3	1.183	1.199	1.162	1.181	0.019
6	1.094	1.085	1.093	1.091	0.005
9	1.148	1.142	1.143	1.144	0.003
14	1.531	1.522	1.513	1.522	0.009
17	1.584	1.579	1.491	1.551	0.052
20	1.587	1.517	1.497	1.534	0.047
23	1.421	1.421	1.413	1.418	0.005

**Tabla 33. Cinética del crecimiento de *L. rhamnosus* R0011 150 en leche Svelty , por espectrofotómetro a 600 nm**

Tiempo ( Horas)	Serie repetición (Lecturas a 600 nm)			Promedio lecturas	Desviación estándar
	A	B	C		
0	0.975	0.979	0.984	0.979	0.005
3	0.933	0.951	0.950	0.945	0.010
6	0.856	0.824	0.925	0.868	0.052
9	0.858	0.863	0.863	0.861	0.003
14	1.357	1.317	1.318	1.331	0.023
17	1.219	1.372	1.219	1.270	0.088
20	1.333	1.311	1.309	1.318	0.013
23	1.336	1.280	1.274	1.297	0.034

### **8.3 Concentraciones de fármacos en plasma sanguíneo y su fracción libre de éste**

#### **Cálculo de la cantidad de fármaco (D) utilizado en quimioterapia**

La cantidad de fármaco a administrar vía intravenosa en quimioterapia es usualmente calculada al multiplicar la superficie corporal (BSA) por una dosis (constante) que ha demostrado tener un efecto benéfico y un margen de seguridad. Esta cantidad de fármaco está basada en las variaciones fisiológicas relacionadas con el metabolismo y eliminación del fármaco, como la función renal y hepática, que es diferente entre individuos, dicha variación está relacionada con la superficie corporal (Dooley MJ et al 2004; Kaestner SA, 2007; Sacco J. et al 2010).

#### **Cálculo BSA**

Se utilizó la fórmula de Du Bois (1916) para calcular la superficie corporal.

$$\text{BSA (m}^2\text{)} = \text{peso (kg)}^{0.425} \times \text{altura (cm)}^{0.725} \times 0.007184$$

**Medidas antropométricas de la población femenina mexicana, utilizadas para el cálculo del BSA.**

Se tomaron en cuenta las alturas y pesos de mujeres mexicanas para el cálculo de la BSA, con las medidas antropométricas obtenidas por la cámara de comercio e industria del vestido (CANAIVE, 2012) mostradas en la siguiente tabla.

<b>Tabla 34 .Medidas antropométricas de la población femenina mexicana y BSA calculado por rango edades</b>				
<b>Rango edades</b>	<b>Peso.</b>	<b>Altura promedio.</b>	<b>BSA.</b>	
<b>mujeres Mexicanas(años)</b>	<b>(Kg)</b>	<b>( cm)</b>	<b>(m<sup>2</sup>)</b>	
<b>18-25</b>	63	160	1.66	
<b>26-39</b>	70	158	1.72	
<b>40-50</b>	72	158	1.74	

## **Cantidades mínimas y máximas de doxorubicina, metotrexato y paclitaxel.**

Se calcularon las cantidades mínimas y máximas de cada fármaco utilizadas en quimioterapia, considerando las dosis mínimas y máximas habituales de monoterapia de cada fármaco y el BSA que presentan mujeres mexicanas por edades. La cantidad mínima del fármaco correspondiente se calculó al multiplicar la dosis habitual más baja utilizada en monoterapia por el BSA más bajo que presentan las mujeres mexicanas. La cantidad máxima del fármaco correspondiente se calculó al multiplicar la dosis habitual más alta utilizada en monoterapia por el BSA más alto que presentan las mujeres mexicanas.

Cálculo ejemplo cantidades mínimas y máximas empleadas habitualmente de doxorubicina.

### **Datos.**

- Dosis habituales monoterapia con doxorubicina, vía intravenosa: 60-75 mg/m<sup>2</sup> , 15-30 mg/m<sup>2</sup>
- BSA mujeres mexicanas: 18-25 años ( BSA=1.66), 26-39 años (BSA=1.72) y de 40-50 años (BSA=1.74)

### **Cálculos.**

- Cantidad mínima de doxorubicina= (dosis mínima doxorubicina) X (BSA más bajo que presenta la población femenina mexicana)
- 24.9 mg de doxorubicina = (15 mg/m<sup>2</sup>) X (1.66 m<sup>2</sup>)
- Cantidad máxima de doxorubicina= (dosis máxima doxorubicina) X (BSA más alto que presenta la población femenina mexicana)
- 130.5 mg de doxorubicina = (75 mg/m<sup>2</sup>) X (1.74 m<sup>2</sup>)

**Tabla 35. Resumen :Cantidades mínimas y máximas habituales de doxorubicina, metotrexato y paclitaxel, administradas vía intravenosa en monoterapia, ajustadas a la población femenina mexicana (18-50 años)**

<b>Fármaco</b>	Rango habituales dosis en monoterapia (mg/m <sup>2</sup> )	Rango BSA mujeres mexicanas (m <sup>2</sup> )	Rango cantidades habituales del fármaco empleado, vía intravenosa, en monoterapia (mg)
<b>Doxorrubicina</b>	15-75	1.66 -1.74	24.9-130.5
<b>Metotrexato</b>	40-80		66.4-139.2
<b>Paclitaxel</b>	135-250		224.1-435

### **Estimación concentraciones de fármacos en plasma**

Volumen de distribución aparente.

Después de que un fármaco se administra, se absorbe y se distribuye en líquidos y tejidos corporales. Sin embargo, no es posible determinar, directamente, la cantidad del fármaco presente en el organismo. Es por esto que se relaciona la cantidad del fármaco en la concentración del mismo, en el plasma para obtener el llamado volumen aparente de distribución.

Así, el volumen aparente de distribución (Vd) se define como el volumen de líquido necesario para contener el fármaco administrado (cantidad del fármaco, D) a la misma concentración que tiene en el plasma, inmediatamente después de la administración intravenosa, en el tiempo 0 (Cp.). La siguiente ecuación expresa esta relación

$$Vd = \frac{D}{C_p}$$

El cociente que resulta representa el volumen en el que aparentemente se diluye la cantidad del fármaco a la concentración la que se encuentra en el plasma. El volumen de distribución carece de significado fisiológico, de ahí el calificativo de aparente.

La variabilidad de los volúmenes aparentes de distribución que muestran los fármacos se atribuye a los compartimentos en los cuales se distribuye ya la afinidad que muestran por proteínas en tejido y sangre. Los volúmenes de distribución grandes corresponden a los fármacos que se enlazan a proteínas tisulares, mientras que los que se concentran en plasma muestran volúmenes más pequeños (Mendoza, N, 2008).

Tabla 36 .Volúmenes aparentes de distribución de doxorubicina, para mujeres mexicanas.					
Edad mujeres (años)	Peso promedio (Kg)	Fármaco	Volumen distribución (L/Kg)	Volumen de distribución, en función del peso corporal (L)	Rango volumen distribución (L)
18-25	63	Doxorrubicina	20	1260	1260-2160
			30	1890	
29-39	70		20	1400	
			30	2100	
40-50	72		20	1440	
			30	2160	

Ejemplo cálculo del volumen de distribución, en función del peso corporal:

Volumen de distribución (L) = Vd (L/Kg peso corporal) X Kg peso corporal

Para una mujer de 63 Kg de peso corporal y un Vd de 20 L/kg para Doxorubicina:

$$1260 \text{ L} = 20(\text{L/Kg}) \times 63(\text{Kg})$$

Para una mujer de 63 Kg de peso corporal y un Vd de 30 L/kg para Doxorubicina:

$$1890 \text{ L} = 30(\text{L/Kg}) \times 63(\text{Kg})$$

Tabla 37 .Volúmenes aparentes de distribución de metotrexato, para mujeres mexicanas.					
Edad mujeres (años)	Peso promedio (Kg)	Fármaco	Volumen distribución (L/Kg)	Volumen de distribución, en función del peso corporal (L)	Rango volumen distribución (L)
18-25	63	Metotrexato	0.4	25.2	25.2-64.8
			0.9	56.7	
29-39	70		0.4	28	
			0.9	63	
40-50	72		0.4	28.8	
			0.9	64.8	

Tabla 38 .Volúmenes aparentes de distribución de paclitaxel, para mujeres mexicanas.

Edad mujeres (años)	BSA (m <sup>2</sup> )	Fármaco	Volumen distribución (L/m <sup>2</sup> )	Volumen de distribución, en función del BSA (L)	Rango volumen distribución (L)
18-25	1.66	Paclitaxel	42	69.72	69.72-281.88
			162	268.92	
29-39	1.72		42	72.24	
			162	278.64	
40-50	1.74		42	73.08	
			162	281.88	

Se utilizaron los volúmenes de distribución reportados para cada fármaco tanto en su ficha técnica anexada en el producto, así como los reportados en la edición electrónica de medicamentos citostáticos.

Concentraciones plasmáticas estimadas de doxorrubicina, metotrexato y paclitaxel.

A continuación se presentan las tablas de concentraciones plasmáticas estimadas de cada fármaco, realizadas utilizando el rango de volúmenes de distribución y las cantidades de cada fármaco empleadas habitualmente. Se empleó la siguiente relación:

$$C_p = \frac{D}{V_d}$$

También se tomó en cuenta el grado de unión a proteínas plasmáticas para estimar la concentración de fármaco que se distribuye a los

órganos, la fracción libre del fármaco es la que se distribuye al cuerpo y da el efecto terapéutico.

Tabla 39. Concentraciones plasmáticas estimadas de doxorubicina, metotrexato y paclitaxel, para mujeres mexicanas(18-50 años)					
Fármaco	Cantidades habituales del fármaco empleado, vía intravenosa, en monoterapia (mg)	Volumen de distribución (L)	% de unión a proteínas plasmáticas del fármaco (%)	Concentración estimada del fármaco en plasma sanguíneo (mg/mL)	Concentración del fármaco libre, que distribuye a órganos (mg/mL)
Doxorrubicina	24.9 - 130.5	1260 - 2160	85	1.153x10 <sup>-5</sup> - 1.036x10 <sup>-4</sup>	1.73x10 <sup>-6</sup> - 1.554x10 <sup>-5</sup>
Metotrexato	66.4 - 139.2	25.2 - 64.8	50	1.025x10 <sup>-3</sup> - 5.524x10 <sup>-3</sup>	5.123x10 <sup>-4</sup> - 2.762x10 <sup>-3</sup>
Paclitaxel	224.1 - 435	69.72 - 281.88	97	7.950x10 <sup>-4</sup> - 6.239x10 <sup>-3</sup>	2.385x10 <sup>-5</sup> - 1.87x10 <sup>-4</sup>

Ejemplo calculo concentraciones del fármaco en plasma y concentraciones libres del fármaco en plasma

El cálculo de la concentración en plasma sigue la siguiente relación:

$$C_p = \frac{D}{Vd} \text{ , donde}$$

C<sub>p</sub>: es la concentración del fármaco en plasma (mg/mL);

D: Es la cantidad del fármaco habitualmente empleado en monoterapia, vía intravenosa. Este valor se estimó para mujeres mexicanas cuyo rango de edad es de 18-50 años.

V<sub>d</sub>: Es el volumen de distribución característico para cada fármaco, valor reportado en la ficha técnica de cada fármaco empleado y revisado en la edición electrónica de medicamentos citostáticos. Este parámetro farmacocinético generalmente viene expresado en L/Kg o L/m<sup>2</sup> con el fin de individualizar la monoterapia a cada paciente.

### Datos de doxorubicina

La cantidad de fármaco empleada habitualmente (**D**) se calculó a partir de las medidas antropométricas de mujeres mexicanas (18-50 años): 24.9 - 130.5 mg

**Vd** también se calculó para mujeres mexicanas (18-50 años) y el VD (L/Kg o L/m<sup>2</sup>) característico de doxorubicina:

1260 – 2160 L

La concentración en plasma (Cp): se calculó con los rangos de D calculados y Vd calculados, el resultado igualmente la Cp tendrá un rango de concentraciones en plasma (mg/mL)

Calculo de la **Cp más baja**: utilizando la cantidad de fármaco más baja y el Vd más alto calculado:

$$Cp \text{ mas baja} = \frac{24.9 \text{ mg doxorubicina}}{\left(2160L \times \left(\frac{1000 \text{ ml}}{L}\right)\right)} = 1.153 \times 10^{-5} \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ de doxorubicina}$$

Del total del fármaco en plasma solo el 15% de este se encuentra libre y migra a tejidos:

El 15% de la concentración total de doxorubicina =  $1.7295 \times 10^{-6} \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$  de doxorubicina

Calculo de la **Cp más alta**: utilizando la cantidad de fármaco más bajo y el Vd más bajo calculado:

$$Cp \text{ mas alta} = \frac{130.5 \text{ mg doxorubicina}}{\left(1260L \times \left(\frac{1000 \text{ ml}}{L}\right)\right)} = 1.036 \times 10^{-5} \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

El 15% de la concentración total de doxorubicina =  $1.554 \times 10^{-5} \frac{mg}{mL}$  de doxorubicina.

**Apéndice 8.4 Tablas nutrimentales de la bebida de amaranto, leche Svelty en polvo. Tablas de IDR e IDS en la población mexicana.**

Nutrientes	Leche vaca (100 g)	Bebida nutritiva de amaranto en polvo (100g)
Contenido energético (Kcal)	61.00 Kcal	101.00 Kcal
Proteínas (g)	3.20 g	13.00 g
Grasas(lípidos)(g)	3.40 g	5.00 g
De las cuales Grasa saturada (g)	2.20 g	0.50 g
Carbohidratos totales(g)	---	67.30
de los cuales azúcares(g)	4.70 g (lactosa)	1 g (lactosa)
Fibra dietética (g)	0.00 g	7.00 g
Cenizas (g)	0.70 g	3.00 g
Humedad (g)	87.98 g	4.00 g
Colesterol	14.00 mg	0.00 mg
Sodio	48.00 mg	22.99 mg
Potasio	138.00 mg	411.00 mg
Calcio	125.00 mg	298.00 mg
Fósforo	96.00 mg	800.00 mg
Manganeso	9.00 mg	4.00 mg
Hierro	0.10 microg	10.00 mg
Tiamina (vitamina B2)	0.04 mg	0.14 mg
Riboflavina (vitamina B2)	0.20 mg	034 mg
Niacina	0.80 mg	0.50 mg
Ácido ascórbico (vitamina C)	2.00 mg	4.50 mg

Tabla 40. Contenido nutrimental de la bebida de amaranto en polvo “naturalmente alegría”.

<b>Información Nutricional VELTY Descremada 800 Grs.</b>		<b>100 g</b>	<b>Por. 200 ml</b>	<b>Por. 250 ml</b>
Porción (200 ml) : 2 cucharadas soperas colmadas de polvo (aprox.20g) disueltas en una taza con 180 ml de agua .				
Porciones por envase : 40 tazas				
				
Energía (kcal)		356	71	89
Proteínas (g)		34,6	6,9	8,7
Grasa Total (g)		1,2	0,24	0,30
Grasa Saturada (g)		0,70	0,14	0,18
Grasa Monoinsaturada (g)		0,30	0,06	0,08
Grasa Poliinsaturada (g)		0,05	0,01	0,01
Ac. Grasos Trans. (g)		0,10	0,02	0,03
Colesterol (mg)		23,0	4,6	5,8
H.de C. disp. (g)		51,7	10,3	12,9
Sodio (mg)		470	94	118
Vitamina A (mcg ER)		460	12%	14%
Vitamina D (mcg)		3,5	14%	18%
Calcio (mg)		1230	31%	38%
Fósforo (mg)		1005	25%	31%

Tabla 41. Contenido nutrimental de la leche descremada Svelty.

Nutrimiento/unidad de medida	VNR	
	IDR	IDS
Proteína g/kg de peso corporal	1	
Fibra dietética g	30	
Vitamina A µg (equivalentes de retinol)		568
Vitamina B1 µg (Tiamina)		800
Vitamina B2 µg (Riboflavina)		840
Vitamina B6 µg (Piridoxina)		930
Niacina mg (equivalente a Acido nicotínico)		11
Acido fólico µg (Folacina)		380
Vitamina B12 µg (Cobalamina)		2,1
Vitamina C mg (Acido ascórbico)	60	
Vitamina D µg (como colecalciferol)		5,6
Vitamina E mg (equivalente a tocoferol)		11
Vitamina K. µg		78
Acido pantoténico mg		4,0
Calcio mg		900
Cobre µg		650
Cromo µg		22
Flúor mg		2,2
Fósforo mg	664	
Hierro mg		17
Magnesio mg		248
Selenio µg		41
Yodo µg		99
Zinc mg		10

Tabla 42 Valores nutrimentales de referencia para la población mexicana

Fuente: NOM-051-SCFI/SSA1-2010.