



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

**Eficacia de los probióticos en la prevención
del cáncer colorrectal**

**Efficacy of probiotics in colorectal cancer
prevention**

Autora

Cristina Moreno Loscertales

Directora

María Ángeles Sáenz Galilea

Facultad de Medicina

2018

Índice

Glosario	3
Resumen	4
Abstract	5
1. Introducción:	6
2. Material y métodos:	11
3. Justificación y objetivo del trabajo:	12
4. Resultados y discusión:	13
4.1 La microbiota intestinal normal y la microbiota asociada al CCR:	13
4.2 Modificación del microambiente gastrointestinal por el CCR	15
4.3 Mecanismos de acción de los probióticos:	17
4.3.A Modificación de la microbiota intestinal:	17
4.3.B Cambios en la actividad metabólica de la microbiota intestinal:	19
4.3.C Unión y degradación de componentes carcinógenos presentes en el lumen intestinal:	20
4.3.D Capacidad de inhibición de la actividad genotóxica:	21
4.3.E. Efectos de los probióticos en la respuesta inmune e inducción de la citotoxicidad en las células cancerígenas:	21
4.3.F. Inducción apoptótica en líneas celulares del CCR	25
4.3.G Inhibición de la proliferación y efecto sobre las lesiones precancerosas.	27
4.3.H. Actividad antioxidante de los probióticos:	28
4.4.I. Mejora de la función de barrera intestinal	29
4.3.J. Producción de compuestos con actividad anti-carcinogénica:	31
4.4 Probióticos y CCR: estudios en seres humanos	34
5. Conclusiones:	36
6. Bibliografía:	37
7. Anexos:	43

Glosario

AD: autosómica dominante

APC: Adenomatous Polyposis Coli

AR: autosómica recesiva

BAL: bacterias ácido lácticas

BaP: benzo[a]pireno

CCR: cáncer colorrectal

CLA: ácido linoleico conjugado

EII: enfermedad inflamatoria intestinal

FCA: focos de criptas aberrantes.

GI: gastrointestinal

HNPPC: cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis

HR- MAS: high-resolution magic angle spinning

IQ: 2-amino-3-metil-3H-imidazo[4,5-f] quinolina

PAF: poliposis adenomatosa familiar

PB: probióticos

QT: quimioterapia

RMN/NMR: resonancia magnética nuclear/ nuclear magnetic resonance

ROS: especies reactantes de oxígeno

RT: radioterapia

SCFA: ácidos grasos de cadena corta (*short-chain fatty acids*)

SI: sistema inmune

Trp-P-2: 3-amino-1 -metil- 5H-pirido[4,3 -b]indol

Resumen

El cáncer colorrectal es el tumor maligno más frecuentemente diagnosticado en la población española con una incidencia al alza en los países desarrollados. La composición de la microbiota intestinal es considerada como un factor de riesgo importante en el desarrollo de este cáncer y los probióticos pueden modular positivamente la composición de ésta. El propósito de esta revisión es discutir el potencial papel de los probióticos en la prevención del cáncer colorrectal y los mecanismos de acción que intervienen en estas modificaciones. Éstos mecanismos incluyen cambios en la actividad metabólica de la microbiota, modulación de la respuesta inmune, actividad antioxidante, inducción de la apoptosis en células cancerígenas, mejora de la función de barrera intestinal, unión y degradación de componentes carcinógenos e inhibición de la actividad genotóxica y de la proliferación celular ejerciendo así efecto sobre las lesiones precancerosas. Los distintos estudios experimentales que han estudiado los cambios en la microbiota intestinal ocurridos durante el proceso de carcinogénesis, han sido esenciales para la comprensión de la función de los probióticos como agentes anticarcinógenos. Del análisis de los estudios de experimentación con probióticos in vitro y en animales se concluye que los probióticos tienen un efecto inhibitorio del desarrollo de lesiones precancerosas. Aunque no se han realizado muchos estudios en humanos que corroboren estos hallazgos, sí se ha observado una creciente evidencia a favor del efecto protector de los probióticos en la prevención del cáncer colorrectal. Sin embargo, continúan siendo necesarios más ensayos clínicos para comprender mejor estos prometedores beneficios

Palabras clave: cáncer colorrectal, microbiota intestinal, probióticos, simbióticos, prevención y focos de criptas aberrantes.

Abstract

Colorectal cancer is the most commonly diagnosed cancer in the Spanish population with a rising incidence in developed countries. In this regard, the composition of the intestinal microbiota is considered as an important risk factor in the development of this cancer and probiotics are able to positively modulate its composition. The purpose of this review is to discuss the potential role of probiotics in colorectal cancer prevention and the mechanisms of action that take part in these modifications. These mechanisms include changes in metabolic activity of the microbiota, immunomodulation, antioxidant activity, induction of apoptosis in cancer cells, improvement of the intestinal barrier, binding and degradation of carcinogenic compounds, anti-genotoxic activity and inhibition of cell proliferation what has an effect on precancerous lesions. Multiple experimental trials that have studied the changes in the carcinogenesis process in the gut microbiota, have been essential for understanding the role of probiotics as anticarcinogenic agents. The information provided by the analysis of *in vitro* and animal interventions concludes that probiotics have an inhibitory effect on the development of precancerous lesions. Even though there are not many studies in humans that corroborate these findings, there is a growing evidence for the protective effect of probiotics in the prevention of colorectal cancer. However, further investigations and more clinical trials are still needed to better understand these promising benefits

Keywords: colorectal cancer, gut microbiota, probiotics, sybiotics, prevention and aberrant crypt foci.

1. Introducción:

Los vertebrados superiores han coexistido con multitud de microorganismos a lo largo de toda la evolución infiriendo de esta relación un más que demostrado beneficio mutuo. Aunque numerosas superficies, tanto internas como externas están colonizadas por microorganismos, el tracto gastrointestinal representa el mayor reservorio existente. En el intestino humano hay diez veces más bacterias – cien billones (10^{14}) - que células eucariotas en todo el cuerpo - 3.72×10^{13} - y la flora bacteriana codifica, en su conjunto, cien veces más genes que nuestro propio genoma (1). Se estima que la flora intestinal comprende unas 1000-1500 especies, contando cada individuo con aproximadamente unas 160, cuyo contenido aumenta de boca a colon con predominio de los microorganismos anaerobios. Se calcula que cada persona alberga una media de 600.000 genes en el tracto digestivo, 300.000 de los cuales serían comunes al 50% de las personas (2). Las variaciones en cantidad y calidad bacteriana a lo largo del tracto gastrointestinal dependen tanto de factores del huésped (nutrientes, factores ambientales, fármacos...) como de factores de las propias bacterias (enzimas, actividad metabólica, capacidad de adhesión, etc.). Esta vasta comunidad microbiana es adquirida desde el comienzo de nuestra existencia por medio del contacto directo con la microbiota materna ya sea a través del canal del parto, por medio del contacto piel con piel, o de la lactancia materna (3). Y es por ello, que los niños nacidos por partos naturales tienen un mayor número de especies de Bifidobacterias que aquellos nacidos por cesárea (4). La especie Bifidobacterium es la predominante en aquellos niños alimentados con lactancia materna siendo los enterococos los que preponderan en niños alimentados con leche de fórmula (5).

El cáncer colorectal (CCR) es el tumor maligno más frecuentemente diagnosticado en la población española, teniendo en cuenta ambos sexos, con 34.331 casos detectados en el año 2017 (1.360.602 a nivel mundial) (6). Con una prevalencia al alza en los países desarrollados. Así pues, se estima que afecta a 1 de cada 20 hombres y a 1 de cada 30 mujeres antes de cumplir los 74 años. En España, la supervivencia a los 5 años se sitúa en este momento, por encima de la media de los países europeos, con un 64% (siendo la europea de un 57%) lo que lo convierte en el segundo cáncer con mayor mortalidad en nuestro país (15.923 defunciones al año) tan sólo precedido por el cáncer de pulmón (7).

Los factores etiológicos del CCR son múltiples e involucran factores de riesgo tanto modificables como no. Como la gran parte de los casos de CCR son esporádicos (aproximadamente un 92%) (8) y los factores de riesgo modificables son su principal causa podemos asumir que la mayoría de casos de CCR pueden ser prevenidos. Por el contrario, se estima que de un 5 a un 15% de todos los casos de CCR pueden ser atribuidos a síndromes

hereditarios que se clasifican en función de la aparición, o no, de pólipos como es el CCR hereditario no asociado a poliposis (HNPCC), anteriormente llamado síndrome de Lynch, que supone un 3% de los casos de CCR. Se trata de un síndrome de herencia autosómica dominante, en el cual, el desarrollo de la carcinogénesis se debe a mutaciones hereditarias en genes reparadores del ADN (hMSH2, hMLH1, hMSH6 o PMS2) (9, 10), que llevan al desarrollo de esta variante de CCR en edades más tempranas. Por otro lado, dentro de estos síndromes hereditarios encontramos diversos síndromes polipósicos que pueden ser clasificados, atendiendo a su estirpe histológica, como se presenta en la [tabla 1](#)

Tabla 1: clasificación de los principales síndromes polipósicos

Síndromes polipósicos hereditarios	Herencia	Gen	Localización
Poliposis adenomatosa familiar	AD	APC	5q21
Poliposis adenomatosa familiar atenuada	AD	APC	5q21
Poliposis adenomatosa asociada a MYH	AR	MYH	1p34.3- 3p32.1
Poliposis hamartomatosa	AD	SMAD4	18q21.1
Síndrome polipósico familiar juvenil	AD	BMPRIA	10q22.3
Síndrome Peutz-Jeghers	AD	STK11/LKB1	19p13.3
Síndrome de Cowden	AD	PTEN	10q23.31
Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba	AD	PTEN	10q23.31

De todos ellos, cabe destacar la poliposis adenomatosa familiar (PAF) que es un síndrome de herencia autosómica dominante, consecuencia de mutaciones germinales en el cromosoma 5 en el gen supresor APC (Adenomatous Polyposis Coli). Esta mutación provoca la pérdida de funcionalidad de la proteína que codifica, produciéndose el desarrollo de multitud de pólipos colónicos desde la infancia. El desarrollo de estos incrementa el riesgo de padecer CCR y se relaciona fundamentalmente con los casos en edades más tempranas (antes de los 45 años) (11).

El CCR esporádico se produce por medio de un proceso secuencial a lo largo de muchos años conocido como secuencia adenoma-carcinoma. Éste da comienzo con una mutación somática en células de la cripta intestinal. Las lesiones más pequeñas detectables son los focos de criptas aberrantes (FCA). Estas lesiones, aunque son de carácter benigno, se caracterizan por ser criptas hiperplásicas y/o displásicas, pudiendo esta hiperproliferación dar lugar a pequeños pólipos. Aunque el desarrollo de un pólipo no implique que necesariamente vaya a derivar en adenocarcinoma, sí que existe un riesgo aumentado de que suceda. La activación de oncogenes como K-RAS unido al silenciamiento de genes supresores de tumores, llevará al paso de pólipo a adenoma. Sobre estos adenomas acaecerán nuevas mutaciones en genes,

como p53, propiciando una conversión de adenoma in situ en adenocarcinoma, adquiriendo capacidad invasiva.

La vía de señalización WNT desempeña un papel importante en el desarrollo normal y restitución del epitelio colónico, observándose en el 90% de los casos de CCR alteraciones en alguno de los componentes de ésta. En la mayor parte de las lesiones, se observa la mutación de genes supresores de tumores, siendo el APC el que muta con mayor frecuencia (en el 63% de los adenomas esporádicos y 80% de los CCR esporádicos) (12). Cuando no existe una mutación de este gen, los que se ven afectados, en mayor grado, son el gen CTNNB (encargado de la expresión de la β -catenina) y la axina.

La proteína APC tiene sitios de unión para numerosas proteínas incluidos los componentes de la vía WNT: axina, β -catenina, y reguladores del citoesqueleto. La APC es la encargada de mantener niveles bajos de β -catenina en ausencia de señal WNT previniendo su acumulación, y una excesiva proliferación. Al mutar estos genes, por acumulación de β -catenina, se produce la activación constitutiva de la vía de señalización WNT en las criptas. De esta forma, se bloquea la diferenciación celular y se promueve la proliferación llevando a un desequilibrio en la zona apical de las criptas entre proliferación y descamación que conducirá a la formación de pólipos (13).

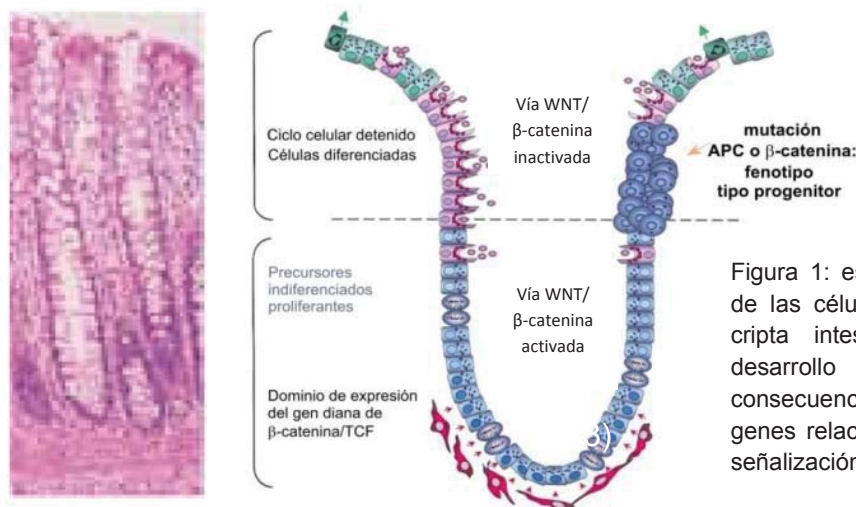


Figura 1: esquema del desarrollo de las células epiteliales en una cripta intestinal normal y del desarrollo epitelial como consecuencia de mutaciones en genes relacionados con la vía de señalización WNT (13).

Al menos la mitad de los cánceres pueden tener implicado en su génesis algún tipo de componente dietético y éstos han sido foco de atención para la comunidad científica en los últimos tiempos. Es generalmente aceptado que los factores ambientales como son la dieta (consumo de carne roja, carne procesada, alcohol, dulces, grano refinado y bajo consumo de frutas y hortalizas) y los estilos de vida (índice de masa corporal elevado, obesidad y escasa actividad física) tienen un impacto importante en el riesgo de padecer CCR. En los últimos años, se ha observado que la composición de la microbiota intestinal es un factor de riesgo para el desarrollo de CCR y es aquí

donde entraría en juego el papel de los probióticos, que por medio de su ingesta en las cantidades adecuadas, pueden prevenir el desarrollo de cáncer.

Aunque el término probiótico es relativamente reciente, no lo es el conocimiento sobre los beneficios que aportan las bacterias ácido-lácticas. Ya en el año 1907, Ilya Ilyich Metjnikov sugirió que las bacterias presentes en los productos lácteos fermentados podían modificar la microbiota intestinal aumentando el número de microbios beneficiosos e inhibiendo el crecimiento de aquellos patógenos.

Los probióticos (PB) se definen como “aquellos microorganismos vivos, que en animales y humanos, ejercen un efecto beneficioso sobre el hospedador, mejorando las propiedades de la microbiota cuando son administrados en las cantidades adecuadas” (14) Éstos se caracterizan por: encontrarse habitualmente en el organismo, adherirse a los enterocitos, persistir y multiplicarse en tiempos cortos, no ser patogénicos, ser capaces de producir compuestos antimicrobianos y ser estables durante los procesos de producción, comercialización y distribución hasta su finalización en el intestino (13). Aunque la mayoría de los PB pertenecen a dos géneros de bacterias productoras de ácido láctico (BAL): Lactobacillus y Bifidobacterium. Existen otros muchos microorganismos utilizados para tal fin, como se recoge en la [figura 1](#). Muchas de las bacterias que se utilizan para los preparados probióticos han sido aisladas de muestras fecales humanas con el fin de maximizar la compatibilidad con la microbiota intestinal mejorando sus posibilidades de supervivencia.

<p style="text-align: center;">Lactobacillus spp.</p> <ul style="list-style-type: none"> •L. Johnsonii •L. Lactis •L. Reuteri •L. Brevis •L. Casei •L. Helveticus • L. Kefir • L. Acidophilus • L. Bulgaricus • L. Rhamnosus • L. Salivarius • L.Plantarum 	<p style="text-align: center;">Bifidobacterium spp</p> <ul style="list-style-type: none"> •B. Adolescentis •B. Bifidum •B. Infantis •B. Longum •B.Breve •B.Lactis 	<p style="text-align: center;">Enterococcus spp</p> <ul style="list-style-type: none"> •E. Faccium •E. Feccalis •E. durans 	
<p style="text-align: center;">Streptococcus spp</p> <ul style="list-style-type: none"> •S. Thermophilus 	<p style="text-align: center;">Lactococcus spp</p> <ul style="list-style-type: none"> •S. lactis 	<p style="text-align: center;">Bacillus spp</p> <ul style="list-style-type: none"> •B. Subtilis •B.coagulans 	<p style="text-align: center;">Otras especies</p> <ul style="list-style-type: none"> •Sacchatomyces cerevisiae •Saccharomyces bolardii •Leuconostoc spp.

Figura 2: microorganismos utilizados como probióticos.

Más allá del objeto de estudio de este trabajo, diversas propiedades de los probióticos han sido utilizadas con éxito en el tratamiento de la diarrea aguda, la prevención de la diarrea producida por antibióticos, la dermatitis atópica, mejora del estreñimiento en pacientes con cáncer, mejora de la intolerancia a la lactosa y, gracias a su capacidad inmunomoduladora, son de gran interés en la prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y otras alteraciones intestinales.

A su vez, dentro de la esfera del CCR no sólo se limitaría su utilidad a la prevención del mismo, ya que hay estudios que han demostrado que el uso de PB produce una mejora funcional y de la calidad de vida (disminución de la frecuencia defecatoria y sensación de tenesmo) posterior a la intervención quirúrgica por CCR (2011 Ohigashi et al. (15)) También se ha observado una disminución de las complicaciones infecciosas postoperatorias con la toma preoperatoria de PB (2012, Zhang et al. (16), 2010, Liu et al. (17)), mejora de la función inmune (objetivada como un aumento significativo de la IL-2, IgA, IgG, IgM y el porcentaje de células CD4(+)) con la toma perioperatoria de PB (2012, Zhu et al.), mejora de la flora en pacientes con CCR que van a ser intervenidos mediante resección quirúrgica, y mejora de la diarrea producida por la quimioterapia en pacientes con CCR (2007, Osterlund et al) y la producida por el tratamiento radioterápico en los mismos (2007, Delia et al. (18)).

En relación a los efectos adversos que pueden derivar del consumo de PB, cabe reseñar que la infección o sepsis son extremadamente raras ya que estos son constituyentes de la microbiota intestinal humana normal y no son patógenos. Los únicos casos de infecciones graves (endocarditis, sepsis y bacteriemia) fueron descritos en pacientes con enfermedades de base. En términos generales, se acepta que el riesgo de que se dé una infección por el consumo de PB es análogo al de infecciones por cepas nosocomiales, incluso en pacientes inmunodeprimidos en los que predominan los efectos beneficiosos sobre los posibles riesgos.

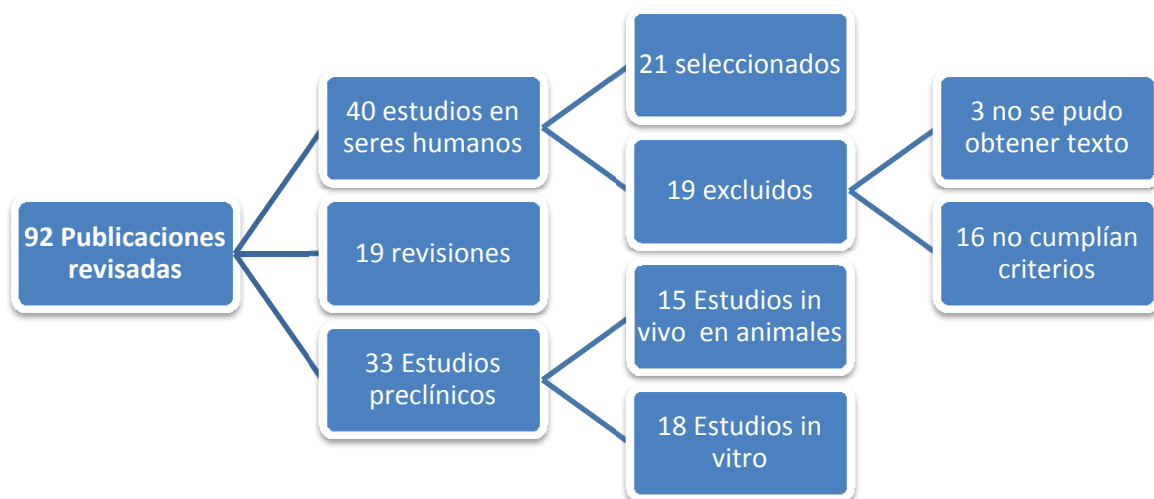
2. Material y métodos:

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión sistemática de la literatura científica sobre la eficacia de los probióticos en la prevención del cáncer colorrectal (CCR) encontrada en las siguientes bases de datos: Pubmed, Scopus, ScienceDirect, Web of Science, Google Scholar, ResearchGate, Chocrane Library, Embase, Ime y Dialnet así como a través de recursos facilitados por la Universidad de Zaragoza (Catálogo Roble). Además, fueron consultadas revistas especializadas en la materia como Hepatogastroenterology y gastroenterology y dos tesis doctorales.

Criterios de selección de las publicaciones: se han revisado un total de 92 publicaciones de la materia comprendidas entre los años 1980 y 2018. Se han recogido artículos que tuviesen en cuenta en su población a estudio:

- Que fuesen estudios en humanos con pacientes de ambos sexos.
- Que fuesen mayores de 18 años.
- Que explorasen el uso de PB en la prevención del CCR

De los 40 estudios en seres humanos que se han encontrado en la bibliografía se han rechazado 19, 3 de ellos por no disponer del texto completo y 16 por no cumplir los criterios anteriores. De este modo, han sido seleccionados y analizados 21 estudios tanto observacionales como experimentales ([ver anexo 1](#)) También se ha realizado una búsqueda de algunos artículos citados en los trabajos seleccionados para profundizar en algunos aspectos.



Palabras clave: cáncer colorrectal, microbiota intestinal, probióticos, simbióticos, prevención, focos de criptas aberrantes.

Keywords/ MeSH terms: colorectal cancer, gut microbiota, probiotics, synbiotics, prevention, aberrant crypt foci.

3. Justificación y objetivo del trabajo:

Actualmente, y a pesar de haberse convertido en una de las líneas de investigación que más se han desarrollado a lo largo de los últimos años, quizá sea el mundo de la microbiota y los probióticos uno de los temas que más controversia generan a nivel científico. Con la inevitable duda tanto para usuarios como para profesionales de la salud entre el binomio ciencia o moda. De ahí que surja la necesidad de presentar evidencia científica que avale los resultados terapéuticos derivados de su empleo en los distintos campos de aplicación y, más concretamente, en el de la prevención del cáncer colorrectal como trata de ser el objeto de esta revisión.

Dada la elevada prevalencia de CCR en nuestro medio y la importancia que supondría la puesta en práctica de cualquier medida preventiva en el desarrollo del mismo, esta revisión se propone valorar la potencial eficacia de los probióticos en la prevención del CCR.

Dado que la composición de la microbiota intestinal es considerada como un factor de riesgo importante en el desarrollo del CCR se busca presentar la evidencia actual de la modulación positiva y las vías y los mecanismos por los que los PB serían capaces de llevar a cabo estas modificaciones en la composición de la microbiota.

4. Resultados y discusión:

4.1 La microbiota intestinal normal y la microbiota asociada al CCR:

El elevado número y diversidad de la microbiota intestinal humana viene reflejado en su amplia capacidad metabólica. Ésta, en una persona sana, debería gozar de un estado de eubiosis, entendido como aquel en el que el número de bacterias beneficiosas excede al de bacterias patógenas. De este modo, se cumplirían los requisitos para poder beneficiarse de efectos sobre la salud a nivel tanto neuronal como inmunitario y metabólico y asegurar, así, una correcta motilidad, digestión y absorción de nutrientes, angiogénesis, crecimiento y efecto barrera de la mucosa. Además, tienen la capacidad de modificar los ácidos biliares y suplementan al ser humano con componentes autótrofos como el folato y la biotina que no pueden ser obtenidos con la dieta (19). Todas estas actividades metabólicas tienen implicaciones de gran magnitud para la salud del huésped dando lugar a efectos tanto beneficiosos como deletéreos (20).

Actualmente, son dos los modelos propuestos para explicar el papel de la microbiota en la aparición del CCR. El primer modelo, propone la teoría del “conductor y pasajero” (*driver-passenger*) en la que ciertos microorganismos serían los encargados de iniciar y promover las mutaciones del ADN de las células epiteliales (conductores), que posteriormente progresarían a tumores malignos. Conforme va sucediendo la progresión tumoral el microambiente va cambiando. Esto favorece la colonización y crecimiento de otros grupos bacterianos que serían los pasajeros. Según esta teoría, las bacterias conductoras, encargadas de iniciar el proceso, no se encontrarían en las lesiones cancerosas por las condiciones desfavorables para su crecimiento que se han desencadenado. Por lo que su presencia, no nos serviría como herramienta diagnóstica. El segundo modelo, sería el llamado “la piedra angular” (*keystone hypothesis*) que establecería que un patógeno es el responsable de la disbiosis del microbioma. En este caso, lo encontraríamos en cantidades muy pequeñas pero su relevancia recaería en la contribución al mantenimiento del desequilibrio del ecosistema (21).

Son diversos los estudios que han tratado de buscar las diferencias entre la composición del microbioma normal de aquel asociado al CCR. Ya en 1995, Moore (22) identifica 15 bacterias asociadas significativamente a un mayor riesgo de padecer CCR (entre ellas especies de los géneros *Bacteroides*, *Eubacterium* y *bifidobacterium*) y cinco asociadas a un menor riesgo de padecerlo (incluidas especies de *Lactobacillus*). Los grupos de *Bacteroides* y *Prevotella* se han encontrado en concentraciones significativamente superiores

en las muestras fecales de pacientes con CCR sin ser estas influidas por la edad, el índice de masa corporal, la historia familiar ni por la localización o tamaño de los tumores (23). Otro ejemplo de patógeno asociado al CCR serían las especies de *Fusobacterium* las cuales han sido documentadas por secuenciación genómica con análisis por hibridación fluorescente in situ (FISH) (24). En concordancia con estos hallazgos, se ha encontrado una prevalencia significativamente mayor de *Fusobacterium nucleatum* en muestras de tejido tumoral en pacientes con CCR frente a muestras de controles sanos.(25, 26). En otro estudio, diferentes cepas de *E. coli* fueron identificadas por medio de biopsias de pacientes con CCR. Estas cepas eran productoras de ciclodulina (toxina que interfiere con el ciclo celular eucariota) lo que sugiere un posible rol de ésta en la patogénesis del CCR (27).

Con el fin de llevar a cabo un análisis más detallado de la microbiota asociada al CCR Wang et al. (2012) amplificaron y secuenciaron la región V3 del ARN ribosomal 16S (componente de la subunidad 30S de los ribosomas) los resultados evidenciaron un predominio de *Enterococcus*, *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Streptococcus* y *peptostreptococcus* y una disminución de *Roseburia* y otras bacterias productoras de butarato.(28) En un estudio con características similares, Chen et al.(29)(2012) analizaron la composición bacteriana del lumen y de la mucosa intestinal de pacientes con CCR frente a pacientes sanos. Sus resultados exponen variaciones significativas en la composición de la microbiota tanto en el lumen como en la mucosa. Se observó un aumento significativo de la proporción de Firmicutos y una reducción de Bacteroidetes y Proteobacterias en el lumen. Por el contrario, la mucosa presentaba una mayor concentración de Lactobacillales y reducción de *Faecalibacterium*. Resultados similares fueron obtenidos por el equipo de Gao (30) en 2015, que evidenciaron que en las muestras de CCR los grupos de Firmicutos, *Fusobacterium* y Lactococos estaban sobreexpresados, mientras que Proteobacteria se infraexpresó. Hibberd et al.(31)(2017) evidenciaron un aumento de la biodiversidad microbiana en aquellos pacientes con CCR y aumento de algunas clases como el *Fusobacterium*, las *Selenomonas* y los *Peptostreptococcus* con respecto a la microbiota de control.

Como acabamos de ver, son diversos los estudios que han demostrado una alta presencia de *Fusobacterium* en los tumores colorrectales y, más concretamente, el *F. nucleatum*. Éste, ha sido correlacionado con una menor infiltración de células T, la mutación del gen BRAF, la hipermutación con inestabilidad de satélites, estadios más avanzados de CCR y una peor supervivencia.(32) En las investigaciones llevadas a cabo por el equipo de Bullman se ha demostrado que la colonización de los CCR con *Fusobacterium* y su microbioma asociado, incluidas especies de bacteroides, *Selenomonas* y *Prevotella*, se mantienen en metástasis distales. Estos hallazgos demostrarían que las bacterias de la microbiota viajan con las células tumorales cuando se

dan las metástasis colonizando también el tejido metastásico. Estas observaciones sugieren que dichas bacterias, más allá de ser compañeras de viaje, podrían ser impulsoras de las metástasis. (Ver figura 3)

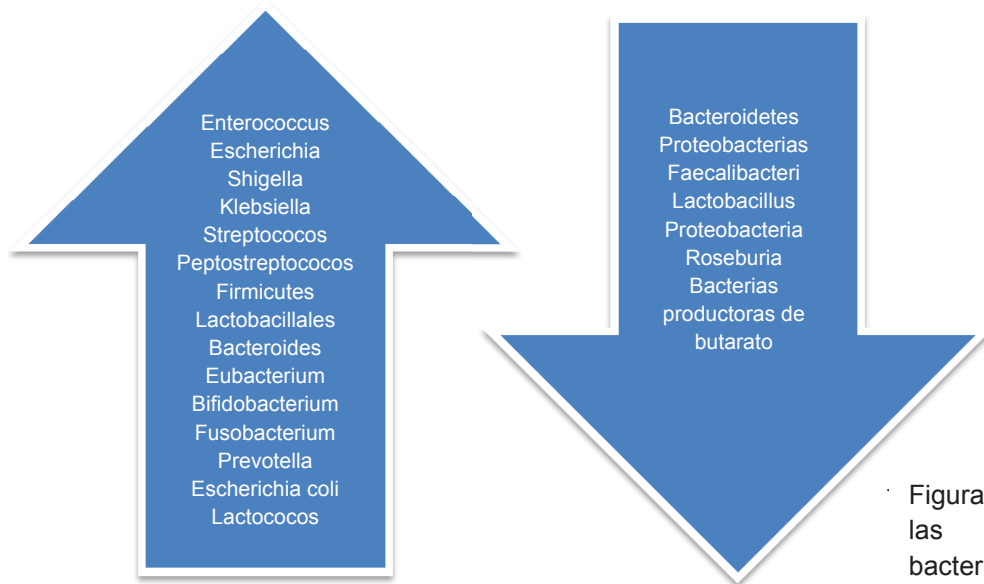


Figura 3: resumen de las modificaciones bacterianas en el CCR.

4.2 Modificación del microambiente gastrointestinal por el CCR

Antes de comenzar a hablar de las vías por medio de las cuales los probióticos llevarían a cabo su acción en la prevención del CCR es necesario tratar las modificaciones que se producen en el microambiente que rodea las lesiones neoplásicas colorrectales.

Bajo la base de cómo la presencia de distintas bacterias pueden interferir en la ya comentada secuencia adenoma-carcinoma se ha propuesto la constante de que los productos finales del metabolismo de los carbohidratos en el intestino (propionato, acetato y butarato) tienen efectos beneficiosos por su capacidad de actuar como nutrientes mientras que los productos del metabolismo proteico (aminas, amonio, índoles y componentes fenólicos y nitrosos) podrían tener efectos perjudiciales para el huésped (33). La capacidad de la microflora de producir mutágenos y carcinógenos a partir de precursores dietéticos así como de producirlos endógenamente está bien documentada:

- La enzima β -glucuronidasa, a partir de su forma conjugada, libera en el colon una serie de carcinógenos (incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos).

- La β -glucosidasa bacteriana hidroliza en el intestino la cicasina en un carcinógeno. Por otro lado, cabe reseñar, que de su metabolismo también pueden derivar sustancias anticarcinógenas como la quercetina.
- La microflora también participa en el metabolismo de los ácidos biliares, el ácido cólico y quenodesoxicólico y su transformación en ácido desoxicólico y litocólico los cuales tienen capacidad estimuladora tumoral.
- Productos procedentes de la desaminación de aminoácidos como la tirosina, el amoniaco, los fenoles y cresoles son considerados promotores tumorales.
- Las sustancias N-nitroso tienen actividad mutagénica y carcinogénica y son producidas mediante la reacción del nitrito con amidas y amins que es catalizada por bacterias intestinales(34)
- También es catabolizada por bacterias intestinales la conversión del carcinógeno procedente de los alimentos cocinados 2-amino-3-metil-3-H-imidazol(4,5-f)quinolina en su derivado 7-hidroxi el cual es un mutágeno de acción directa.

Diversos estudios han evidenciado que la microbiota en torno a las lesiones neoplásicas es significativamente distinta al del intestino normal. Ya en 1993, Moreno et al. (35), utilizando la espectrometría de RMN para comparar biopsias de la mucosa normal colónica frente a la tumoral, demostraron que en esta última estaba aumentada la concentración de componentes endógenos como el lactato, taurina, espermina, glutamato, aspartamo, glutatión y la glicerofosfoetanolamina y disminuida la de mioinositol y siloinositol. Más recientemente, Hirayama et al. (36) evidenciaron un aumento en los tejidos colónicos tumorales de las concentraciones de la mayoría de aminoácidos (excepto de la glutamina) y del lactato y una disminución de los niveles de glucosa y piruvato lo que podría ser justificado por el aumento de la actividad glicolítica de las células tumorales en un ambiente con escasa vascularización. Chan et al. (37) utilizando la cromatografía de gases, la espectrometría de masas y la HR-MAS NMR (técnica basada en la RMN que aporta información estructural de alta resolución de tejido intacto, es decir, sin necesidad de ningún procedimiento de extracción de metabolitos) identificaron en las muestras de CCR un aumento de los niveles de aquellos componentes que contenían colina: taurina, silo-inositol, glicina, lactato, fosfoetanolamina y fosfocolina; así como se observó un aumento de las concentraciones de lactato, L-prolina, ácido palmítico, ácido margánico, ácido oleico, L-glicina, L-fenilalamina, fosfato, uridina, ácido 11-14-eicosadienoico, ácido 11-eicosenoico, 1-O-heptadecilglicerol, 1-monooleoglicerol, propil-octadecanoato y colesterol y menores niveles de lípidos, polietilenglicol y glucosa que en la mucosa normal. En la [figura 4](#) se sintetizan todas estas modificaciones del microambiente intestinal en el CCR.

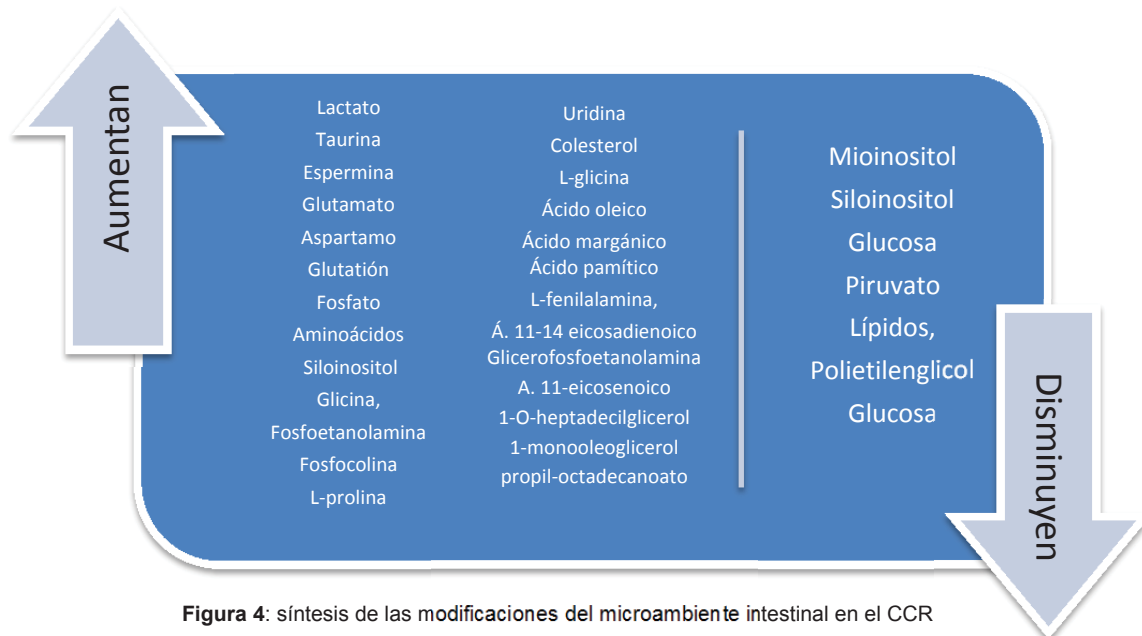


Figura 4: síntesis de las modificaciones del microambiente intestinal en el CCR

4.3 Mecanismos de acción de los probióticos:

4.3.A Modificación de la microbiota intestinal:

Los PB donde realmente ejercen una mayor función es a nivel del intestino delgado de ahí la importancia que tiene, en un primer lugar, mostrar la evidencia existente de su capacidad para modificar la microbiota intestinal a nivel colorrectal. Para poder sobrevivir, los PB, desde que entran por la boca, deben ser resistentes al pH, ácidos biliares, enzimas proteolíticas, péptidos antimicrobianos, la peristalsis intestinal y la secreción luminal de IgA (38). Tanto los estudios experimentales como los clínicos sugieren que el consumo periódico de PB puede mejorar el perfil cualitativo y cuantitativo de la microbiota colorrectal. Ya en 1978, Gilliland et al. (39) demostraron en un ensayo clínico que, los pacientes que consumieron leche a la que se añadió *Lactobacillus acidophilus* en su composición aumentaban las concentraciones de *Lactobacillus* facultativos fecales frente a los que tomaron placebo y que este aumento era superior a mayor concentración de PB administrados. Sin embargo, no se observaron cambios en los *Lactobacilos* anaerobios o coleriformes fecales. En el *anexo 1* se presentan otros estudios intervencionistas en humanos que evidencian con resultados similares cómo la toma de PB modifica la microbiota intestinal:

- Aumento significativo de *Lactobacillus* en la flora intestinal con el consumo de *Lactococcus* y *Lactobacillus acidophilus* junto con buey frito (40)
- Aumento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* en heces y disminución del número de *Clostridium* y enterobacterias con el consumo de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* (41).

- *L. casei* Shirota demostró que puede modular la composición intestinal con un aumento significativo de la presencia de *Lactobacillus* en heces a la que se asoció un aumento de *Bifidobacterium* (42).
- Con la suplementación de *Lactobacillus rhamnosus* DR20 fueron detectados en heces *Lactobacillus* y *enterococcus* en mayor proporción, sin significación estadística (43).
- Con la toma de un simbiótico enriquecido con *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium lactis* Bb12 el número de *Clostridium perfringens* disminuyó significativamente (44).
- Tras la administración de *Lactobacillus rhamnosus* LC705 junto a *Propionibacterium freudenreichii*ssp *shermanii* se observó un aumento significativo de *Lactobacillus* y *Propionibacteria* en heces (45).
- Con la toma de un simbiótico que contenía *Bifidobacterium lactis* se observó un aumento significativo de la proporción de *Lachnospiraceae* spp fecal (46).
- Disminución significativa de *C. perfringens* fecal con la toma de *Lactobacillus Gasser* (47).

Otros estudios más recientes como el llevado a cabo por Hibberd et al. (31)(2017) ratifican estos datos. En él, por medio de la realización de biopsias colónicas y análisis fecal se observó un aumento de algunas especies bacterianas productoras de butirato, especialmente *Faecalibacterium* y *Clostridium* spp en la mucosa tumoral, en la no tumoral y en las heces. Asimismo se observó una tendencia a la reducción de *Fusobacterium* y *Peptostreptococcus* en aquellos pacientes con CCR que iban a ser sometidos a intervención quirúrgica y se les había administrado PB (1.4×10^{10} CFUs de *B. Lactis* BI-04 y 7×10^9 CFUs de *L. Acidophilus* NCFM), en comparación con aquellos pacientes a los que no se les habían administrado. Análogamente, Liu et al., en 2010 demostraron un aumento en el número de bacterias tras la cirugía, incluyendo *Bifidobacterias* y *Lactobacilos*, en el grupo que había consumido PB, observándose una mayor variedad de bacterias fecales, mientras que en el grupo placebo se observó una reducción (17). En contraposición, el número de *Enterobacterias*, *Pseudomonas* y *Cándidas* disminuyó en el grupo que había tomado PB.

Los probióticos serían capaces de reducir las poblaciones de bacterias patógenas por medio de diferentes vías como sería la competencia por receptores de adhesión así como por nutrientes y factores de crecimiento. Otros, son capaces de producir sustancias antibacterianas como bactericidas, ácido láctico, reuterina y peróxido de hidrógeno que inhiben el crecimiento o eliminan las bacterias patógenas del lumen intestinal. Todas las modificaciones comentadas que se observan en la composición de la microbiota están directamente relacionadas con la reducción del riesgo de desarrollo de CCR.

4.3.B Cambios en la actividad metabólica de la microbiota intestinal:

Algunas de las bacterias que están presentes en el intestino humano son capaces de producir carcinógenos a partir de productos obtenidos exógenamente de la dieta, y de las sales biliares de producción endógena. Como ya se ha tratado en el apartado 4.2, esto es posible por la presencia y actividad de algunas enzimas como son la β -glucosidasa, la β -glucuronidasa, azoreductasa, nitratoreductasa y 7- α -dehidroxilasa, las cuales son capaces de convertir en carcinógenos activos los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las aminas aromáticas heterocíclicas y los ácidos biliares primarios así como sintetizar fenoles, cresoles, amonio, agliconas y componentes nitrogenados. Estos metabolitos tienen actividad citotóxica o genotóxicas que pueden llevar a un crecimiento anormal y a la activación de vías antiapoptóticas en los colonocitos y, por consiguiente, contribuir al desarrollo de CCR. Algunas especies de bacterias patógenas como Clostridium, Bacteroides, Eubacterium y Escherichia coli presentan una mayor actividad de las enzimas productoras de carcinógenos. De todo esto deriva la posibilidad de poder modificar por medio del uso de PB dichas actividades enzimáticas mediante la modificación de la microbiota como se ha comentado anteriormente.

Los efectos de los probióticos sobre las enzimas bacterianas intestinales han sido estudiados tanto en animales como en humanos. Los pioneros Goldin y Gorbach (48), en 1976, estudiando ratas a las que se les administró una dieta rica en carne suplementada con L. Acidophilus, observaron una disminución de un 40-50% de la actividad de la β -glucuronosidasa, azorreductasa y nitroreductasa fecales cuantificando la excreción fecal de los productos de reacción de estas enzimas. En un estudio análogo en ratas Cole et al. (49) demostraron una disminución significativa de las actividades de la β -glucuronosidasa y de la β -glucosidasa al ser alimentadas con L. Acidophilus. Takano et al. Fueron de los primeros investigadores en examinar en ratas los efectos de la leche fermentada con Lactobacillus y Cándida sobre la carcinogénesis en el CCR encontrando una reducción de la tumorigénesis inducida por la 1,2 dimetilhidralazina (DMH). Rowland et al. (50) describieron un mayor efecto de la combinación simbiótica (probiótico + prebiótico) en la disminución de las actividades enzimáticas y los metabolitos fecales con la administración de B. Longum junto a inulina con respecto a la administración únicamente del PB. Así se evidenció una disminución del 55% de la actividad de la β -glucuronosidasa en las ratas a las que se les administró el simbiótico.

En cuanto a la evidencia en humanos (*anexo 2*) existen diversos estudios que avalan dicha disminución de la actividad enzimática como el de Goldin et al. (51) en el que se objetivó una reducción de la actividad fecal de la β -glucuronosida y nitroreductasa tras la suplementación con Lactobacillus

acidophilus. El mismo Goldin en esta ocasión junto a Gordbach en 1984 durante su investigación observó una reducción de la actividad de las tres enzimas estudiadas β -glucuronidasa, nitroreductasa, y azoreductasa únicamente durante el periodo de que se tomaron PB volviendo a valores normales en el periodo de control (52) En el trabajo de Marteau et al. (53) no se observaron cambios en la actividad de la azoreductasa y la β -glucuronidasa en ninguno de los tres periodos estudiados con la toma de *L. acidophilus* y *B. bifidum*. Por el contrario, sí que lo hizo la actividad de la nitroreductasa. Bertazzoni Minelli et al. (41) en 1996 llevaron a cabo otro estudio en el que se produjo una reducción significativa de la actividad de la N-acetil-P-glucosaminidasa en heces con la administración de *L. acidophilus* y *B. bifidum*. También las investigaciones de Spanhaak et al (42) demostraron que el uso de PB (*L. casei* Shirota en este caso) puede modular la composición y la actividad metabólica intestinal observando una disminución significativa de la actividad de la β -glucuronidasa y β -glucosidasa. Por último, el equipo de Hatakka en 2008 (45) demostró una disminución de la actividad de la β -glucosidasa de un 10% y de la ureasa en un 13% con la toma de *L. rhamnosus* LC705 junto a *Propionibacterium freudenreichii* ssp.

4.3.C Unión y degradación de componentes carcinógenos presentes en el lumen intestinal:

Algunas especies de PB son capaces de metabolizar e inactivar los componentes carcinógenos presentes en el lumen, especialmente, los N-nitroso y las aminas aromáticas heterocíclicas. Esta capacidad parece estar asociada con los intercambios catiónicos que tienen lugar entre éstos y los péptidoglicanos presentes en la pared celular de algunos PB que serían posteriormente eliminados junto a las bacterias con las heces. Aunque esta capacidad de unión y degradación parece depender, en gran medida, de la cepa de PB utilizada, la dosis, la viabilidad del microorganismo y otras condiciones ambientales como son el pH y la presencia de sales biliares y enzimas GI (54). De ahí que sea cuestionable si sucede por medio de un mecanismo del mismo tipo in vivo, por ser éste altamente dependiente del pH. Así quedó patente en el estudio de Bolognani et al. (55) en el que se observó como la eficiencia de la unión de algunos PB como *B. longum* a los carcinógenos estudiados (Trp-P-2, IQ, B(a) P...) fue mayor con un pH en torno a 5. Con valores más ácidos o alcalinos esta capacidad de unión disminuía marcadamente. De ahí que podamos esperar que se produzca ésta unión en el estómago humano, el cual tiene un pH de alrededor de 4-5 inmediatamente tras la ingesta. Conforme la comida pasa al intestino delgado (que es el principal lugar de absorción de carcinógenos) el pH luminal (en torno a 7.5)

haría desfavorable la unión a carcinógenos posibilitando así su absorción. Estas pesquisas hacen necesarios más ensayos clínicos en humanos para clarificar si este mecanismo podría darse in vivo y no resultaría inhibido por las condiciones encontradas en el tracto GI humano.

4.3.D Capacidad de inhibición de la actividad genotóxica:

Al evaluar la capacidad que tienen los cultivos de PB para prevenir las mutaciones y lesiones del ADN (consideradas como un acontecimiento temprano en el proceso de carcinogénesis) en cultivos celulares o en animales, se han obtenido pruebas directas de su capacidad protectora frente al cáncer. En conjunto, los resultados hablan de una evidencia in vitro de que las BAL inhiben la genotoxicidad de los carcinógenos dietéticos, siendo ésta dependiente de la especie.

Tanto Pool-Zobel et al. (56) como Rowland et al. (57) investigaron la capacidad de algunas BAL para inhibir las lesiones en el DNA de la mucosa colónica de ratas a las que se les trató con los carcinógenos N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) o 1,2-dimetilhidracina (DMH). Todas las cepas de Lactobacilos y bifidobacterias estudiadas previnieron las lesiones inducidas por los carcinógenos reduciendo, en la mayoría de los casos, la lesión hasta un nivel equiparable al de las ratas no tratadas con carcinógenos. Cabe destacar que el efecto protector antígenotóxico fue dosis dependiente y el *Streptococcus thermophilus* demostró inferioridad en su eficacia con respecto al resto de cepas BAL. Todos estos resultados comentados proporcionan evidencia a favor de los efectos protectores de las BAL frente a los estadios precoces del CCR.

4.3.E. Efectos de los probióticos en la respuesta inmune e inducción de la citotoxicidad en las células cancerígenas:

Aunque la interacción entre los probióticos y el sistema inmune (SI) intestinal es extremadamente compleja, los avances en la investigación de la microbiota han demostrado que es esencial para la maduración del SI y el desarrollo de la tolerancia inmunológica. Además, ésta juega un papel importante en la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa a un nivel tanto local, en la mucosa, como sistémico.

Las personas con (EII) tienen una probabilidad cinco veces mayor de desarrollar CCR en comparación con un individuo sano (19). Esto es debido a que la inflamación crónica puede afectar a la composición de la microbiota y

aumentar su potencial genotóxico. De este modo, podríamos hablar de la existencia de una fuerte correlación entre la microbiota, el SI y el riesgo de CCR. Por otro lado, algunas bacterias intestinales como el *Bacteroides fragilis* y el *Streptococcus bovis* por su capacidad de activar células del SI y liberar citoquinas proangiogénicas y promitóticas como IL-6 e IL-7 (58) aumentarían el riesgo de desarrollar CCR.

El uso de PB como inmunomoduladores es una práctica común y en auge hoy en día que se basaría en la interacción que tiene lugar entre las células inmunes presentes en el tracto GI y los PB o sus metabolitos. De esta forma, se induce la respuesta inmune de la mucosa intestinal y se activa toda la red de señales que involucra. Pero ¿cómo pueden estos antígenos tan particulares, sin tener factor de virulencia, evadir todas las barreras del huésped y regular el SI de la mucosa intestinal?

Los PB pueden llegar al intestino a través de las distintas rutas de internalización por las que llegan los antígenos. Una vez allí, interactúan con las células M de la placa de Peyer o con células del epitelio intestinal e internalizarse.

Tras esto, las primeras células con las que interactuarían serían las células presentadoras de antígenos, macrófagos o células dendríticas asociadas a la lámina propia. Por otro lado, pueden ser directamente captadas por células inmunes asociadas, como serían las células dendríticas o los macrófagos de la lámina propia a través de receptores como los Toll-like y los Nod-like (38). (Ver figura 5). Tras este reconocimiento, las células inmunes y epiteliales comienzan con la secreción de citoquinas que pueden ser de ayuda para la regulación de la respuesta inmune innata y adquirida (59).

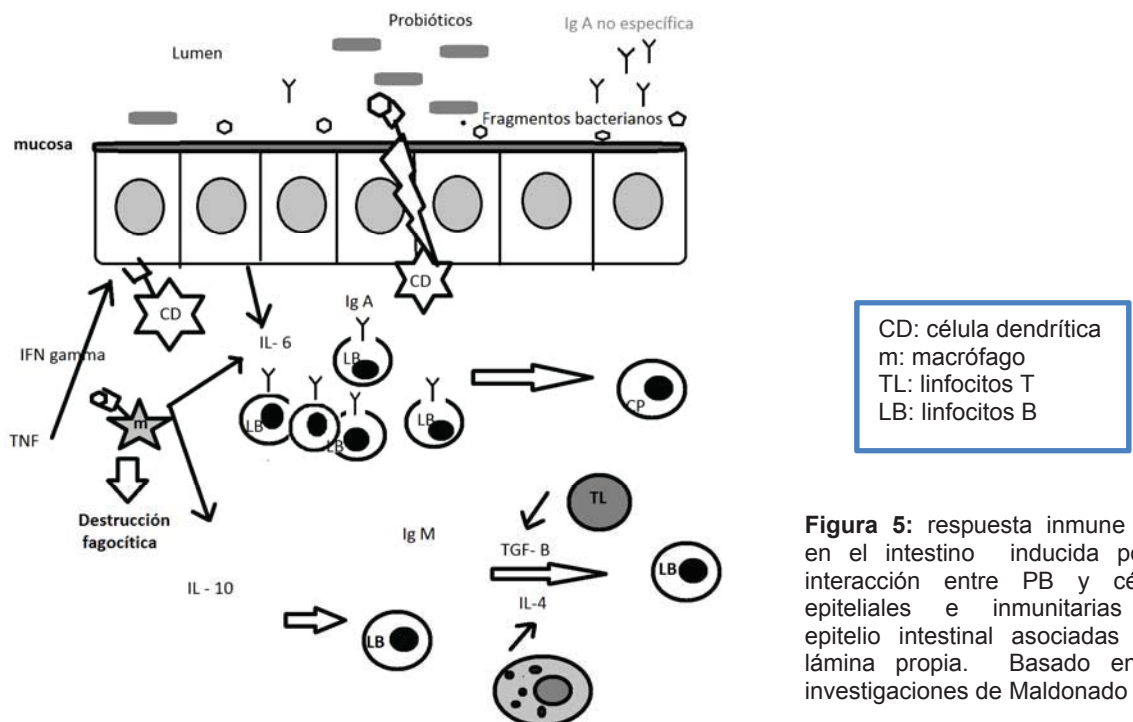


Figura 5: respuesta inmune local en el intestino inducida por la interacción entre PB y células epiteliales e inmunitarias del epitelio intestinal asociadas a la lámina propia. Basado en las investigaciones de Maldonado et al.

De esta forma, los PB, por medio de su capacidad de producir citoquinas antiinflamatorias (IL-10 y el TGF- β) (54) y de disminuir las proinflamatorias (IFN- λ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 y el TNF- α) podrían retrasar la aparición de células cancerígenas.

La evidencia experimental in vitro sugiere que la actividad anti-cáncer de los PB operaría a través de un proceso de citotoxicidad contra las células tumorales. Estudios como el de Nami et al. han objetivado cómo los metabolitos del *L. acidophilus* son los que gozan de un mayor efecto citotóxico en las líneas celulares del CCR(60). Dentro de sus acciones sobre el SI, las bacterias ácido lácticas (BAL) en estudios in vitro y en experimentación animal han demostrado:

- Inducir la secreción de citoquinas en sangre periférica (59).
- Inducir la maduración de las células dendríticas y, consecuentemente, la activación de los linfocitos T reguladores en el intestino (61).
- Inducir la citotoxicidad de las células natural killer (62).
- Inducir la producción de β -2-defensina.
- Inhibir la secreción de IL-23 (dependiente de la señal TLR-2).
- *L. delbrueckii* y *L. acidophilus* han evidenciado aumentar la producción de IgG1 e IL-4.
- Disminuir la expresión de la COX-2, la cual ha sido asociada a un riesgo aumentado de desarrollar CCR al ser estimuladora de la proliferación celular y de los procesos inflamatorios.
- Aumentar la producción de inmunoglobulina A (63). Con la toma de *Lactobacillus johnsonii* las concentraciones séricas se incrementaron (64). Esta Ig, gracias a su capacidad para resistir la proteólisis, actúa en la barrera intestinal limitando el contacto de los colonocitos con los componentes del lumen potencialmente carcinogénicos y crea un ambiente antiinflamatorio por su incapacidad de activar el sistema del complemento y la respuesta proinflamatoria (65). El aumento del número de células productoras de IgA fue la propiedad más remarcable inducida por los PB y el yogurt de leche fermentada (63).
- Se ha visto que *L. casei* tiene la capacidad de inducir la IL-15 en las células del epitelio intestinal y ésta, a su vez, inducir células Natural Killer intraepiteliales (66).
- De los estudios de Soltan Dallal et al. (67) (2012) se infiere un aumento significativo de la producción de IL-12, IFN- λ y NK en ratones tras la administración de *L. casei*.
- Disminuir la proteína C reactiva en sangre (68).
- Activar los fagocitos, los cuales tienen la capacidad de eliminar las células tumorales en estadios tempranos de evolución, lo que contribuiría al mantenimiento del estado de vigilancia activa. Como es el caso de *L. rhamnosus* HN001, que ha mostrado efectos dosis dependientes en el sistema de defensa fagocítico en ratones, además

de aumentar la actividad de los leucocitos en sangre periférica y de los macrófagos peritoneales (69).

- Los niveles séricos de IFN- λ γ , IL-10 y el número de CD4+ y CD8+ incrementó significativamente con la toma de *L. acidophilus* (70).
- Un exopolisacárido purificado obtenido de *Lactobacillus plantarum* JLK0142 administrado a ratones a altas dosis aumentó significativamente el contenido intestinal de IgA y los niveles séricos de citoquinas, IL-2 y TNF- α (71).
- Chiba et al., han que el *L. casei* tiene el potencial de inducir la producción de IL-12 y promover el desarrollo de las células Th1.

Dentro de los estudios existentes en humanos (*ver anexo 2*), Rafter et al. (44) en el 2007 llevaron a cabo dos estudios paralelos; utilizando un simbiótico compuesto por oligofructosa con inulina, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium lactis* Bb12. En el primero, administrado a pacientes con PAF observaron una disminución significativa de los marcadores de toxicidad celular e inflamación. En otro estudio análogo pero tras resección colónica por CCR se obtuvo un aumento significativo de la actividad del interferón gamma. En ese mismo año, Roller et al. (72) administrando un simbiótico compuesto por *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis* e inulina enriquecida con oligofructosa obtuvieron una mayor secreción de IL-2 en el grupo de pólipos y una mayor producción de IFN- γ en el grupo con cáncer. Por último Ohara et al. (47) con la toma de *Lactobacillus Gasser* observaron una actividad de la IL-1 beta y de los NK significativamente mayor a partir de la cuarta semana.

Al analizar globalmente los perfiles de las citoquinas inducidas por las BAL, observamos, que los efectos más remarcables atañen al TNF- α , IFN- γ e IL-10, para todas las cepas de PB estudiadas. Esto se manifiesta con un ligero aumento de la celularidad pero, sin observarse incremento en la respuesta inflamatoria (38). La inducción del TNF- α , por parte de los PB, sería necesaria para iniciar la interacción entre las células inmunes de la lámina propia y las del epitelio intestinal. De igual modo, el IFN- γ podría jugar un importante papel fisiológico ya que se ha demostrado que es necesaria esta citoquina para la maduración de algunas de las células del SI como son las células dendríticas y que también intervendría en el control de la proliferación a nivel intestinal

Cabe remarcar que la actividad inmunomoduladora de los PB depende de su permanencia y supervivencia en el tracto GI, de la cepa administrada, su dosificación y frecuencia de administración. De acuerdo con Galdeano et al(38). Se requerirían dosis de 10^8 a 10^9 UFC/d de una cepa con efecto inmunomodulador y un tiempo de permanencia en el intestino de entre 48 y 72 horas para inducir inmunoestimulación en el huésped. De esta forma, no cabría

esperar que todos los probióticos sean capaces de modular la respuesta inmune y ser capaces, consecuentemente, de prevenir el CCR.

Con toda la evidencia científica existente, el equipo de Maldonado Galdeano propone que esta propiedad moduladora de los PB sobre el SI debería ser incorporada al término “Probiótico”. De esta forma, estaríamos dotando a los PB del potencial preventivo de infecciones, crecimiento tumoral y otras enfermedades sistémicas, incluidos efectos a nivel de mucosas a distancia como en bronquios, glándulas mamarias y tracto urogenital (38).

4.3.F. Inducción apoptótica en líneas celulares del CCR

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que juega un papel muy importante tanto en la proliferación como en la muerte celular. La alteración de esta capacidad de inducir la muerte celular y la alteración de la proliferación estarían detrás de muchos tipos de cáncer y es la que define la velocidad de su desarrollo. De aquí se deduce que la mayoría de los quimioterápicos utilizados hoy en día actúen a través de la inducción de la apoptosis.

Diversos estudios han mostrado cómo los PB juegan un papel importante en la regulación de la muerte celular a través de vías intrínsecas y extrínsecas que son mecanismos críticos en la prevención del cáncer. Pero, a día de hoy, poco se conoce sobre los mecanismos por medio de los cuales las BAL inducirían la apoptosis por vía de la regulación a la baja de los productos genéticos dependientes del factor nuclear kappa (NF- κ B) que regula tanto la proliferación celular (COX-2, ciclina D1) como la supervivencia celular (Bcl-2, Bcl-xL) (73).

El aumento de esta incidencia de la apoptosis inducida por el consumo de PB se le ha atribuido a los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y, en concreto, al butirato. Este SCFA es capaz de inducir cambios epigenéticos, parar el ciclo celular y estimular la expresión de genes proapoptóticos. Por consiguiente, se ha observado una relación inversa entre la presencia de SCFA en heces y la proliferación celular en las criptas colónicas. La inmunomodulación también sería otra posible vía que contribuye a la apoptosis, especialmente, por medio del incremento de la producción de TNF- α (74).

Las investigaciones de Jan et al. (75) han demostrado la capacidad del *Propionibacterium freudenreichii* de inducir la muerte celular en el cáncer gástrico y colónico por medio de la secreción de cadenas cortas de ácidos grasos en el medio de cultivo lo que indujo signos de apoptosis como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de la caspasa-3, pérdida del potencial transmembrana mitocondrial y condensación de la

cromatina del núcleo. Le et al. (76) evidenciaron que el consumo de un simbiótico que contenía *B. lactis* facilitó la respuesta apoptótica frente a un carcinógeno genotóxico. Baldwin et al. (77) demostraron que *L. Acidophilus* y *L. Casei* son capaces de aumentar la inducción de la apoptosis en líneas celulares del CCR (LS 513) sugiriendo así la actividad anticáncer de ambos. El potencial apoptótico de estos dos PB se vio incrementado en presencia de 5-fluouracilo; esto podría ser debido a que la caspasa 3 se activaría más rápidamente y por una regulación a la baja de la p21.

En 2012 Chen et al. demostraron una reducción de la carcinogénesis colorrectal además de un aumento de la apoptosis con la administración de *L. acidophilus* a ratones. Ese mismo año, el equipo de Cousin et al. (78) propone otro mecanismo por medio del cual los PB inducirían la apoptosis en el cáncer digestivo. Utilizando en su experimentación el *P. freudenreichii* observaron una inducción de la condensación de cromatina, de los cuerpos apoptóticos y fragmentación del ADN, así como acumulación de ROS, activación de caspasas e inactivación del potencial de acción transmembrana de las mitocondrias. En 2013, Hwang et al. También publican sus hallazgos, reforzando así la teoría de que las BAL son capaces de inducir la apoptosis. En este caso, sugieren que lo harían por medio de la inhibición de la NF- κ B y la señalización mediada por mTOR en líneas celulares de cáncer gástrico.

Esta modulación de la capacidad apoptótica no estaría limitada al cáncer gastrointestinal. Son varias las cepas de PB que han mostrado influir en otros cánceres, como los hematológicos o el cáncer de cérvix. En la Leucemia Mieloide Crónica el *L. reuteri* ha demostrado aumentar la apoptosis inducida por el TNF, por medio de la modulación del NF- κ B, la señalización de la protein-quinasa y la condensación de proteínas mediadoras de la proliferación celular (COX-2 y ciclina D1) e inhibidoras de la apoptosis (Bcl-2, Bcl-xL) (79).

Con todo esto, podemos concluir que los PB con capacidad de modular la proliferación celular y la apoptosis pasarían a tener un gran interés en la eliminación de las células cancerígenas.

Estas acciones las llevarían a cabo a través de la inmunomodulación, el aumento de la producción de SCFA y el aumento de la expresión de genes y proteínas que intervienen en la regulación del proceso de apoptosis. Podrían realizar esta función de un modo menos agresivo que otras técnicas como la radioterapia o la quimioterapia ya que la apoptosis no conlleva daño en las células vecinas y no causa inflamación.

4.3.G Inhibición de la proliferación y efecto sobre las lesiones precancerosas.

Los focos de criptas aberrantes (FCA) constituyen lesiones compuestas por criptas morfológicamente anormales en la superficie de la mucosa colónica y recto. Son uno de los cambios más tempranos que se pueden observar en la secuencia que conduciría al carcinoma.

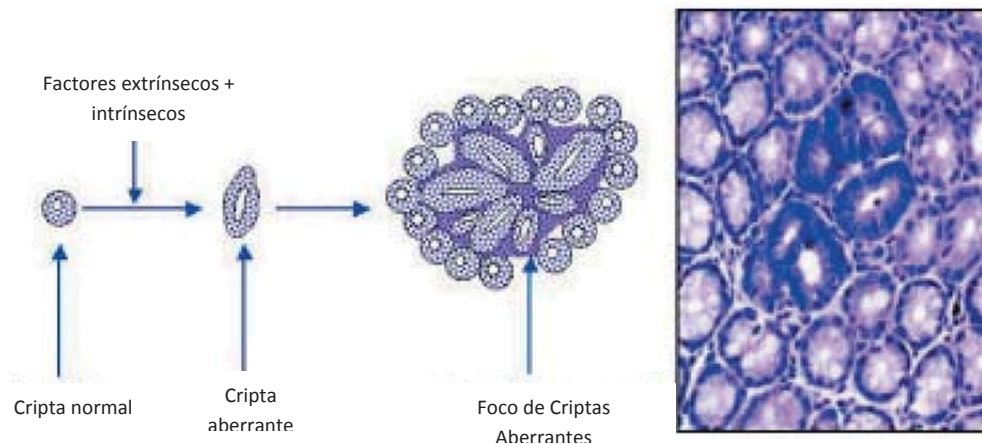


Figura 6: mecanismo de formación de focos de criptas aberrantes en el colon.
Imagen tomada de la USA & Canadian Academy of Pathology.

En experimentación animal, los FCA, cuyo hallazgo es predictor del desarrollo de tumores en un estadio más avanzado, son inducidos en la mucosa colónica mediante el tratamiento con diversos carcinógenos como DMH, azoximetano (AOM) e imidazoquinolina (IQ). La mayoría de estos estudios fueron realizados con protocolos de “iniciación y promoción” que consisten en que los animales son alimentados con PB y, pasada una semana, se les administra el carcinógeno y se continúa con los PB hasta el sacrificio del animal procediendo a la evaluación de los FCA.

De este modo, se ha descrito una inhibición del 50% (80), del 26% (50) y del 23% (81) de la formación de FCA en ratas alimentadas con *Bifidobacterium longum* a las que se les inyectó AOM. Abdelali et al. (82) estudiaron en ratas los efectos de la administración tanto de *Bifidobacterium* spp. como de leche desnatada y leche fermentada. Las bifidobacterias fueron sutilmente más eficaces en la reducción de las FCA (61%) que la leche fermentada con bifidobacterias 49%, si bien cabe destacar que, por sí sola, la leche desnatada las redujo en un 51%.

En otro estudio con ratas en las que se indujo CCR con DMH, tratadas con diferentes dosis de *B. longum* se demostró una disminución del índice mitótico

de los colonocitos y de la proliferación celular de las criptas colónicas en comparación con el grupo de control, lo que condujo a un descenso del 25 al 30% en la cantidad de FCA (83). Zhu et al. en un estudio análogo observaron que el tratamiento con *L. salivarius* Ren redujo la proliferación celular en las criptas colónicas y consecuentemente, una disminución de los FCA de un 40% (84).

Recientemente, Agah et al. (70) (2018) observaron una inhibición significativa de la incidencia de lesiones colónicas de aproximadamente un 57% con la administración de *L. acidophilus* y de un 27% con *B. bifidum* sobre ratones en los que se había inducido CCR con AOM. Cabe reseñar que en el mismo estudio los niveles séricos de los marcadores tumorales CEA y CA 19-9 disminuyeron significativamente con *L. acidophilus*. También en 2018, Melo et al. (85) administrando kéfir (bebida láctea que contiene *Lactobacillus acidophilus*) diariamente a ratones en los que se habían inducido FCA con inyecciones de AOM, observaron que los FCA eran atenuados en, aproximadamente, un 43% en altura y un 20% en anchura frente al grupo de control. Sin embargo, no todos los estudios que han tratado el efecto protector de los PB sobre el desarrollo de FCA han deparado efectos positivos como el llevado a cabo por Gallaher et al. (86), que utilizando *L. acidophilus* y *B. longum* obtuvieron resultados inconsistentes que dichos autores atribuyen a las diferentes edades de las ratas cuando se les administró DMH.

4.3.H. Actividad antioxidante de los probióticos:

El estrés oxidativo se ha descrito como un desequilibrio entre las especies reactantes de oxígeno (ROS) y las defensas antioxidantes del cuerpo. Cuando ocurre este desequilibrio, se induce el daño oxidativo del ADN que se considera un paso preliminar en la carcinogénesis de algunos cánceres inducidos por fármacos. Se ha sugerido que los PB podrían ser eficaces en la reducción de este daño oxidativo en el ADN causado por agentes químicos carcinógenos tanto *in vitro* como *in vivo* (73).

La evidencia existente en estudios experimentales apunta a que la administración oral de algunas especies de BAL y sus productos metabólicos, reducen el riesgo de acumulación de ROS, degradan aniones superóxido y peróxido de hidrógeno (87).

En un metaanálisis, llevado a cabo por Heshmati et al. en 2018, que ha analizado artículos que incluyen un total de 1363 sujetos (709 casos y 699 controles) se ha demostrado que los parámetros que miden los niveles de estrés oxidativo (la capacidad antioxidante total, el glutatión, la superóxido dismutasa y el óxido nítrico, fueron significativamente mayores en los grupos que tomaron

probióticos o simbióticos en comparación con los controles. Además, los niveles de malondialdehído fueron inferiores que en los controles. Por lo que el estudio concluiría con que la suplementación con PB y simbióticos mejora la capacidad antioxidante y aumenta el número de enzimas antioxidantes presentes en el cuerpo (88.(88) Este mismo año se publica el estudio realizado por Xu et al. (89) cuyos hallazgos sugieren que unas biomoléculas sintetizadas por *L. casei* 393 poseen actividades antioxidantes y anticáncer significativas y que pueden ser una alternativa para la síntesis de partículas de selenio con potenciales aplicaciones como anticáncer y agente antioxidante.

4.4.I. Mejora de la función de barrera intestinal

La barrera intestinal ejerce la importante función de proteger nuestro cuerpo de la invasión de los microorganismos presentes en el lumen intestinal y de las agresiones físicas y químicas.

Esta barrera está compuesta por una capa de células epiteliales -los colonocitos- algunas células inmunitarias, células caliciformes y de Paneth, la capa mucosa, las proteínas de unión, la IgA, el pH, los péptidos antimicrobianos y los microorganismos que componen la microbiota (74). Cualquier alteración de la barrera aumentaría la interacción entre el huésped y la microbiota intestinal, llevando a un estado de inflamación crónica y, por consiguiente, al desarrollo de CCR. Los microorganismos de la microbiota pueden cambiar las condiciones de la barrera modificando su permeabilidad. Esta acción la ejercerían cambiando tres componentes de la misma:

- **pH intracolónico**

Las personas con CCR tienen unos valores superiores de pH intracolónico en comparación con individuos sanos que pueden ser justificados por una menor cantidad de ácidos y SCFA. Estos ácidos pueden ser producidos por la actividad metabólica de los PB consiguiendo así valores de pH más bajo.

Los valores inferiores de pH inhiben la proliferación de las bacterias patógenas así como la producción de componentes carcinogénicos. El ácido láctico y el ácido acético, más allá de disminuir el pH, aumentan la peristalsis que impide la adhesión de las bacterias patógenas a los colonocitos con la consiguiente disminución del tiempo de contacto de los carcinógenos con la mucosa intestinal (90).

- Producción de mucinas:

La composición y la cantidad de mucina producida por la barrera mucosa está sometida a dinamicidad e influida por la composición de la microbiota. El proceso de carcinogénesis disminuye la producción de mucina lo que aumenta la posibilidad de que los componentes carcinógenos contacten con los colonocitos contribuyendo al desarrollo de un estado inflamatorio y, por consiguiente, de CCR. Algunos PB son capaces de aumentar la producción de mucina por parte de las células caliciformes a través de la regulación del gen MUC 2 pero faltarían estudios de mayor consistencia al respecto ya que hay contradicción entre distintos autores respecto a este mecanismo de acción de los PB.

- Proteínas de unión celular:

Estas proteínas están formadas por un complejo de proteínas transmembrana (claudinas y ocludinas) que se unen al citoesqueleto de los colonocitos formando las uniones estrechas. El cambio en la estructura y expresión de las proteínas de unión celular hacen que los colonocitos se adhieran entre ellos. Estos cambios pueden ser propiciados por la inflamación crónica y los procesos de carcinogénesis (90). (Ver figura 7)

El consumo regular de PB puede reducir la permeabilidad intestinal por medio del cambio de la distribución de estas proteínas. Por lo tanto, disminuyen la cantidad de carcinógenos potenciales y componentes inflamatorios que se absorben y previenen así del daño a los colonocitos y, por ende, el CCR. El consumo regular de una mezcla de PB (*L. plantarum*, *L. acidophilum* y *B.longum*) en personas con CCR ha demostrado aumentar las proteínas de unión celular (Claudina y JAM-1) y mejorar su distribución por el epitelio colónico, haciéndolo más continuo y reduciendo, por tanto, la permeabilidad celular (17).

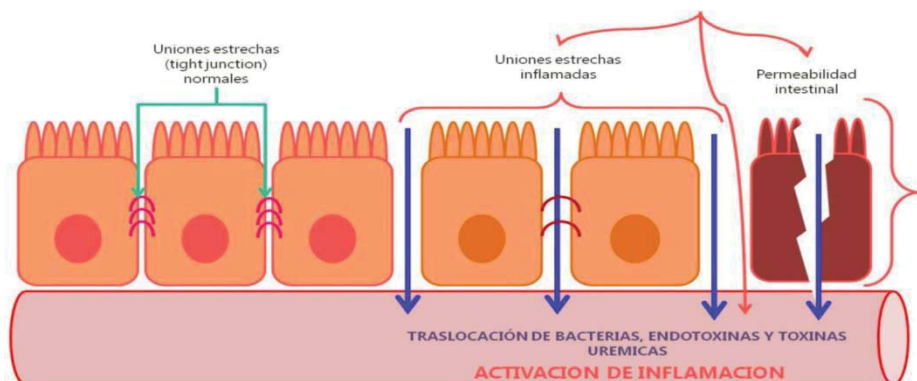


Figura 7: pérdida de integridad de las uniones estrechas. (91)

4.3.J. Producción de compuestos con actividad anti-carcinogénica:

Los microorganismos probióticos son capaces de producir componentes con actividad anti-carcinogénica como son:

I) Ácidos grasos de cadenas cortas:

Los SCFA son el producto final de la fermentación bacteriana de los carbohidratos no digeribles procedentes tanto de la dieta como de la producción endógena. Dentro de los SCFA, en cuanto a CCR se refiere, uno de los más estudiados es el butirato. Éste se encarga de regular el equilibrio entre proliferación, diferenciación y apoptosis de los colonocitos. El butirato se encuentra en mayor cantidad en las heces de personas sanas en comparación con personas con CCR.(92)

Las poblaciones de Clostridium son capaces de producir butirato mientras que las BAL no lo producen. Sin embargo, algunas especies de bacterias como E. halli son capaces de convertir el acetato y lactato en butirato.(74). Por lo tanto, de aquí se deduce que la producción de butirato es dependiente de la composición que tenga nuestra microbiota, de la dieta y de la composición química de los carbohidratos ingeridos así como de la presencia de otros metabolitos lo que ayudaría a entender los resultados discordantes que se dan en la literatura.

Por otra parte, el butirato es capaz de: (93)

- Mejorar la función de barrera epitelial: incrementa la producción de moco y la proliferación de células sanas (ya que es el mayor sustrato energético de los colonocitos).
- Estimula la producción de los factores de crecimiento y las citoquinas antiinflamatorias como IL-10 .
- Regula la actividad de las proteínas que participan en la apoptosis (como Bcl-2, Bak y caspasasa 3 y 7).
- Disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias (por medio de la inhibición del NF-kB).
- Aumenta la actividad de la glutathion-S-transferasa que tiene actividad antioxidante.
- Aumenta la inmunogenicidad de las células tumorales.
- Inhibe la acción de la COX 2.
- Estimula la producción de péptidos antimicrobianos.
- Inhibe la deacetilación de las histonas.

Todos estos efectos resultan en una regulación del silenciamiento de genes que participan en procesos de control del ciclo celular, proliferación, diferenciación y apoptosis. SCFA se producen de manera natural por las bacterias que forman parte de la microbiota.

Tras el butirato, el ácido propiónico es el segundo SCFA más utilizado por los colonocitos como fuente de energía. Éste, junto al ácido acético, presentan actividad antiinflamatoria al ser capaces de suprimir la activación de del factor nuclear de transcripción kappa B y regular la expresión genética de las enzimas proinflamatorias. (94)

De este modo, podemos concluir que, aunque los SCFA son producidos de forma natural por las bacterias de la microbiota, no son producidos en una cantidad suficiente como para prevenir el CCR. Por lo tanto, el consumo de PB puede contribuir a un aumento de su producción diaria. Cuando son administrados como simbióticos, gracias a que el prebiótico actuaría como sustrato para las bacterias de la microbiota, aumenta su capacidad de producción de SCFA.

II) **Ácido linoleico conjugado (CLA):**

Algunas especies de PB como el *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, etc. son capaces de producir ácido linoleico conjugado. Este ácido graso se produce a nivel del ileon distal e interacciona o es absorbido por los colonocitos del lumen intestinal, realizando así su acción a un nivel local. El CLA tiene la capacidad de aumentar la expresión del PPAR- γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) que está involucrado en la modulación del metabolismo lipídico, la apoptosis y la inmunidad. También se ha demostrado la influencia del CLA en la expresión de genes involucrados en el proceso de apoptosis (caspasa 3, caspasa 9 y Bcl-2) y de la respuesta celular a los factores de crecimiento celular. Además, el CLA es capaz de suprimir la producción de eicosanoides en los colonocitos por dos vías. La primera consistiría en la sustitución del ácido araquidónico de las células de la membrana por CLA. La segunda, resultaría de la interferencia del CLA en la actividad de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa. (74) El PB *Pediococcus pentosaceus* GS4 ha demostrado producir CLA a través de la bihidrogenación, lo que podría ser vital para mitigar el CCR. Este CLA producido, in vitro, ha demostrado inducir la apoptosis en líneas celulares de CCR (HCT-116) a través de la actividad de la caspasa3, la fragmentación de ADN y la deacetilación de las histonas. También el *P. pentosaceus* GS4 ha demostrado, en experimentación animal, disminuir eficientemente el CCR y su severidad.(95) Esta capacidad anticarcinógena del CLA sería dosis dependiente y el consumo de PB con capacidad de aumentar su producción podrían producir una cantidad suficiente para promover el efecto anti carcinogénico en el CCR.

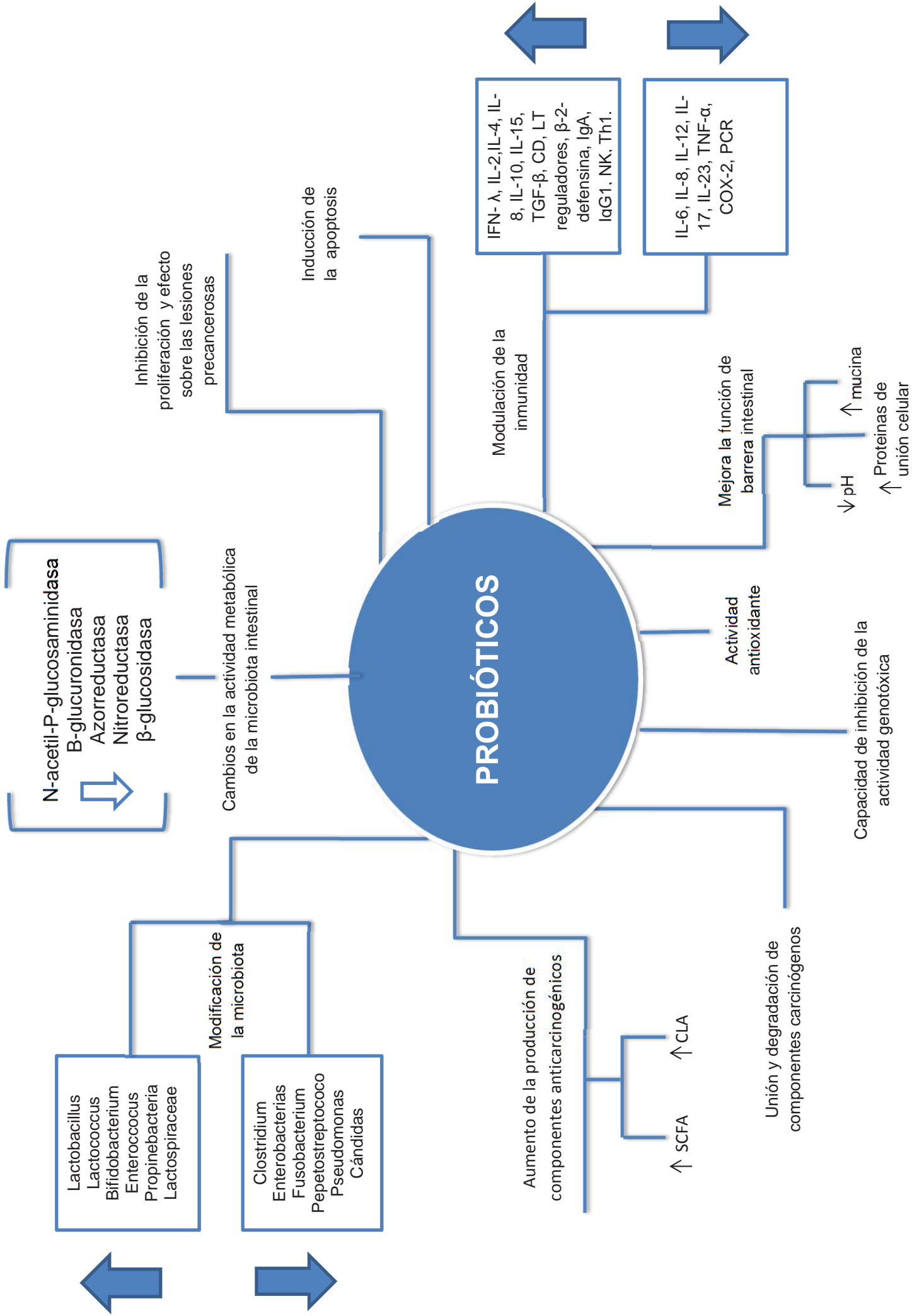
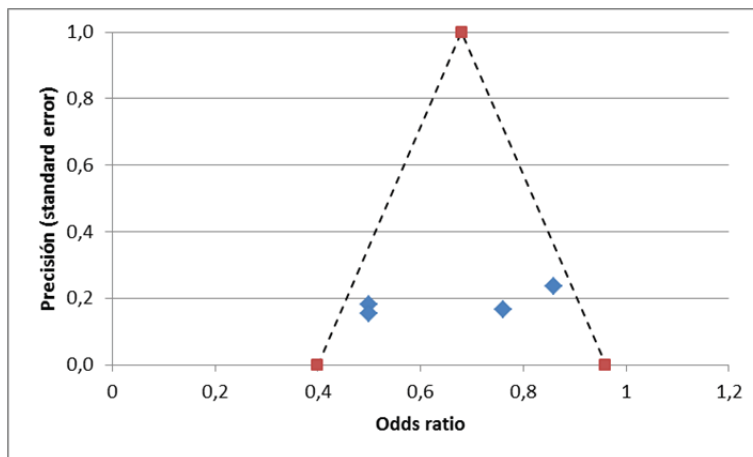


Figura 3: mecanismos de acción de los PB en la prevención del desarrollo de cáncer colorrectal. Símbolos: ↑ aumenta, ↓ disminuye.

4.4 Probióticos y CCR: estudios en seres humanos.

Los estudios realizados en humanos recogen datos más indirectos y la evidencia es más circunstancial que la ofrecida por la evidencia en animales. Sin embargo, estos estudios presentan la ventaja de que está tratando con la población directamente implicada en la prevención del CCR y la información obtenida es más fácilmente aplicable. A su vez, estamos estudiando una población más heterogénea que la utilizada en la experimentación.

En un primer momento, llama la atención los pocos estudios en humanos existentes en la literatura sobre el efecto de los probióticos en el CCR. Lo primero que hay que plantearse es la posibilidad de que existiese un sesgo de publicación y que aquellos estudios con resultados no concluyentes, negativos o sin significación alguna no hayan sido publicados. De aquí surge la necesidad de la realización de un *funnel plot*. (ver figura 9)



Aunque contemos con muy pocos estudios para analizar en nuestro gráfico, la tendencia observada es una distribución simétrica. Ésta, nos hablaría a favor de que no existe sesgo de publicación.

Figura 9: funnel plot realizado con los estudios del anexo 3.

El encontrarnos frente a un número reducido de estudios también podría explicarse por los largos periodos de seguimiento que son necesarios para el desarrollo del CCR y las grandes inversiones económicas necesarias para poder llevar a cabo este tipo de experimentación en humanos. De ahí que la gran mayoría de los estudios sean muestras pequeñas, con seguimiento durante cortos periodos de tiempo y medidas muy determinadas sobre actividad enzimática, mutagénica o inmunitaria. Estos estudios nos aportan una evidencia más indirecta sobre la prevención del CCR, como se ha ido exponiendo a lo largo de la discusión. Con muestras tan pequeñas, es muy difícil que el p valor sea significativo aunque las diferencias observadas sean grandes, lo contrario de lo que ocurriría con tamaños muestrales grandes.

El único estudio que presenta sus resultados con una mirada dinámica (hazard ratio) es el llevado a cabo en 2011 por Pala et al.(96) que contó con 45.241 participantes. En él, durante los 12 años de seguimiento se observó una disminución significativa del riesgo de progresión a CCR. Dicha reducción fue de un 35% en aquellas personas que habían consumido yogur con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* en su composición (HR: 0.65 IC (0.48–0.89)).

Pese a que hay muy pocos estudios que se presenten con medidas de asociación (4 estudios con odds ratio y 2 con riesgo relativo) (Ver anexo 3) se han combinado los primeros en forma de forest plot para poder analizarlos más fácilmente. (Ver figura 10)

Como se puede observar en la gráfica dos de estos estudios incluyen en sus intervalos de confianza el valor nulo por lo que carecerían de significación estadística.

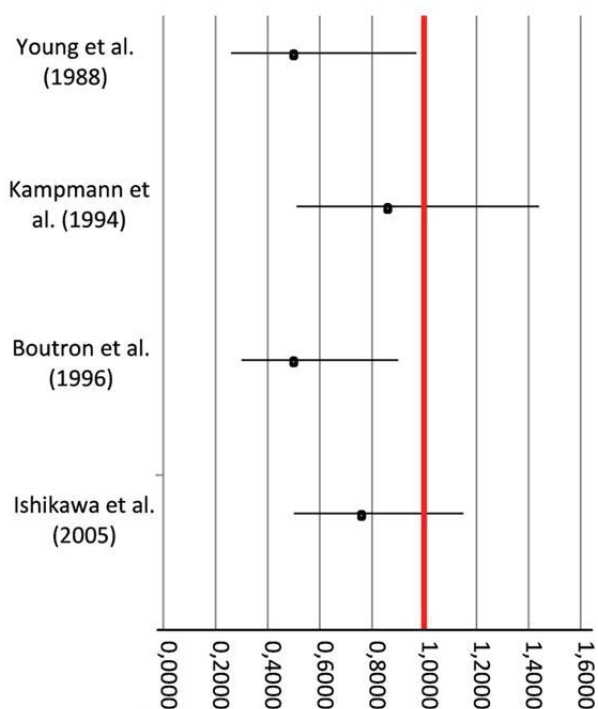


Figura 10: forest plot realizado con los datos del anexo 3.

El estudio de Peters et al. pese a ser el trabajo de un estudio de casos y controles, viene expresado en RR al haberse realizado una regresión logística demostró un Efecto protector significativo del consumo de yogur en ambos sexos (RR de 0.82, IC (0.71-0.94)). Sin embargo, Kearney et al. No encontraron asociación entre el consumo de productos lácteos fermentados y la aparición de CCR

Cabe añadir que en los estudios retrospectivos analizados, es muy difícil determinar la cantidad de PB consumido así como las cepas ya que se hacen aproximaciones indirectas y se tiene en cuenta, a partir de cuestionarios sobre hábitos alimenticios completados por cada paciente, el consumo de yogur o productos lácteos fermentados que contienen probióticos.

5. Conclusiones:

A pesar de la heterogeneidad en la cepa de probiótico utilizado para la realización de los estudios, la dosis, la duración, las diferencias en el diseño de los estudios, hipótesis planteadas y resultados, encontramos que las pruebas generales arrojan una creciente evidencia a favor del efecto protector de los probióticos en la prevención del cáncer colorrectal.

Los estudios que han tratado el tema han demostrado que la disbiosis microbiana observada en los pacientes con CCR puede ser modificada por medio de los probióticos. También puede deducirse a raíz de los estudios en modelos de experimentación animal tratados en esta revisión que los PB, con o sin prebióticos, tienen un efecto inhibitorio en el desarrollo de lesiones precancerosas (focos de criptas aberrantes). Además, estos microorganismos pueden incidir directamente en la inmunidad intestinal e inhibir los procesos inflamatorios subyacentes por medio de la intensificación de la respuesta inmune alterando los filotipos bacterianos en el colon e impactando así en la microbiota intestinal.

A día de hoy, no podemos afirmar que el consumo de una determinada cepa de probióticos, en una cantidad concreta, durante un tiempo determinado, disminuya el riesgo de padecer CCR con el nivel de evidencia necesario. Por otra parte, podríamos hacer una recomendación generalizada de su uso al ser componentes que, además de poderlos encontrar en diferentes preparados farmacéuticos, se encuentran en yogures y productos lácticos enriquecidos, los cuales, carecen de efectos adversos importantes y no supondrían un gran desembolso. Los mayores beneficiados de esta recomendación resultarían ser las poblaciones con mayor riesgo de desarrollar CCR como son las personas con EII o síndromes hereditarios asociados.

Continúan siendo necesarios más modelos de experimentación intervencionista en seres humanos para poder comprender y valorar mejor estos prometedores beneficios en torno a la prevención y tratamiento del CCR. Los resultados de estos estudios podrían llevar a aproximaciones más racionales y estandarizadas sobre el uso de los probióticos en el CCR, especialmente, en cuanto a las especies bacterianas con mayor potencial anticarcinogénico, incidiendo sobre los potenciales efectos adversos en personas inmunodeprimidas y así poder finalmente establecer recomendaciones de dosis y frecuencia de uso con mayor evidencia científica.

6. Bibliografía:

1. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59–65.
2. MetaHIT: Data analysis [Internet]. 2018. Available from: <http://www.metahit.eu/index.php?id=357>
3. Zhu Y, Michelle Luo T, Jobin C, Young HA. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Lett*. 2011 Oct;309(2):119–27.
4. Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev*. 2010 Jul 1;86(1):13–5.
5. Benno K, Sawada K, Mitsuoka T. The Intestinal Microflora of Infants: Composition of Fecal Flora in Breast-Fed and Bottle-Fed Infants were fed a commercial infant-formula . They were born at Toho University Hos pital , Ota Ward , Tokyo and delivered by the vaginal route . None had a hi. *Media*. 1984;28(9):975–86.
6. Observatorio del Cáncer de la AECC. Incidencia y mortalidad de cáncer colorrectal en españa en la población entre 50 y 69 años. 2018;2–3.
7. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las cifras del Cáncer en España 2018. *Soc Española Oncol Médica*. 2018;24.
8. Hagggar F a, Boushey RP. Colorectal Cancer Epidemiology : Incidence , Mortality , Survival , and Risk Factors. *Clin Colon Rectal Surg*. 2009;6(212):191–7.
9. Chung D, Rustgi A. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med*. 2003;138(7):560–70.
10. Söreide K, Janssen E, Söiland H, Körner H, Baak J. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg*. 2006;93(4):395–406.
11. Sánchez De Abajo A, Caldés Llopis T. Poliposis asociada al gen MYH. *Gastroenterol y Hepatol Contin*. 2009;8(4):210–4.
12. Leedham S, Schier S, Thliveris A, Halberg R, Newton M, Wright N. From gene mutations to tumours—stem cells in gastrointestinal carcinogenesis. *Cell Prolif*. 2005;38:387–405.
13. Peñalver BI. Efecto de una dieta suplementada con microcápsulas de probióticos y quercetina en ratones APC Min/+. Universidad pública de Navarra; 2013.
14. Serban D. Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Lett*. 2014;3(245):258–70.
15. Ohigashi S, Hoshino Y, Ohde S, Onodera H. Functional Outcome , Quality of Life , and Efficacy of Probiotics in Postoperative Patients with Colorectal Cancer. *Surg Today*. 2011;41(9):1200–6.
16. Zhang X, Liu Z, Huang M, Wang L, Huang N, Peng H. The effects of perioperative probiotic treatment on serum zonulin concentration and subsequent postoperative infectious complications after colorectal cancer surgery: a double-center and double-blind randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr*. 2012;97(1):117–26.
17. Liu Z, Qin H, Yang Z, Xia Y, Liu W, Yang J. Randomised clinical trial: the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post-operative infectious complications in colorectal cancer surgery - a double-blind study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;33(1):50–63.
18. Delia P. Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea. *World J Gastroenterol*. 2007;13(5):912.
19. Azcárate-Peril M, Sikes M, Bruno-Bárcena J. The intestinal microbiota,

- gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer?. *American Journal of. Physiol Liver Physiol.* 2011;301(3):401–424.
20. Burns A, Rowland I. Prebiotics and probiotics in the prevention of colon cancer. *Gastroenterol Hepatol.* 2003;26(Supl 1):73–84.
 21. Avilés-Jiménez, Francisco Guoqin Y, Torres-Poveda K, Vicente-Madrid M, Torres J. On the Search to Elucidate the Role of Microbiota in the Genesis of Cancer: The Cases of Gastrointestinal and Cervical Cancer. *Arch Med Res.* 2017;48(8):754–65.
 22. Moore W, Moore L. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Env Microbiol.* 1995;61:3202–3207.
 23. Sobhani I, Tap J, O'Roudot-Thoraval F, Roperch J, Letulle S, Langella P, et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer patients. *PLoS One.* 2011;6(1).
 24. Kostic SD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012;22:292-298.
 25. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012;22:299-306.
 26. Viljoen K, Dakshinamurthy A, Goldberg P. Quantitative profiling of colorectal cancer-associated bacteria reveals associations between *Fusobacterium* spp., enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) and clinicopathological features of colorectal cancer. *One* 2015;10:e. *Plos.* 2015;10(0119462).
 27. Buc E, Dubois D, Sauvanet P, et al. High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PLoS One.* 2013;8(56964).
 28. Wang T, Cai G, Qiu Y, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J* 2012;6:320-329.
 29. Chen W, Liu F, Ling Z, et al. Human intestinal lumen and mucosa associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 2012;7:39743.
 30. Gao Z, Guo B, Gao R, et al. Microbiota dysbiosis associated with colorectal cancer. *Front Microbiol* 2015;6:20.
 31. Hibberd A, Lyra A, Ouwehand A, Rolny P, Lindegren H, Cedgård L. Intestinal microbiota is altered in patients with colon cancer and modified by probiotic intervention. *BMJ Open Gastroenterol.* 2017;4(1):145.
 32. Bullman S, Pedamallu C, Sicinska E, Clancy T, Zhang X, Cai D, et al. Analysis of *Fusobacterium* persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science* (80-). 2017;15(358(6369)):1443–8.
 33. Davis C, Milner J. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J Nutr Biochem.* 2009;20:743–52.
 34. Burns A, Rowland I. Prebiotics and probiotics in the prevention of colon cancer. *Gastroenterol Hepatol.* 2003;26(Supl 1):73-84.
 35. Moreno A, Arus C. Quantitative and qualitative characterization of ¹H NMR spectra of colon tumors, normal mucosa and their perchloric acid extracts: decreased levels of myo-inositol in tumours can be detected in intact biopsies. *NMR Biomed.* 1996;9:33–45.
 36. Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, et al. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res* 69 4918–4925, 2009. 2009;69:4918–25.
 37. Chan E, Koh P, Mal M, Cheah P, Eu K, Backshah I A, et al. Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *J Proteome Res.* 2009;8:352–61.
 38. Maldonado Galdeano C, De Moreno De Leblanc A, Vinderola G, Bibas Bonet

- ME, Perdígón G. Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. Vol. 14, *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007. p. 485–92.
39. Gilliland S, Speck M, Nauyok G, Giesbrecht F. Influence of Consuming Nonfermented Milk Containing *Lactobacillus acidophilus* on Fecal Flora of Healthy Males. *J Dairy Sci*. 1978;61(1):1–10.
 40. Lidbeck A, Overvik E, Rafter J, Nord E G. Effect of *Lactobacillus acidophilus* Supplements on Mutagen Excretion in Faeces and Urine in Humans. *Microb Ecol Health Dis*. 1992;5:59–67.
 41. Minelli B, Benini A, Vicentini L, Andreoli E, Oselladore M. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* Administration on Colonic Microbiota and its Metabolic Activity in Premenstrual Syndrome. *Microb Ecol Health Dis*. 1996;9(6):247–60.
 42. Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr*. 1998;52(12):899–907.
 43. Tannock GW, Munro K, Harmsen HJM, Welling GW, Smart J. Analysis of the Fecal Microflora of Human Subjects Consuming a Probiotic Product Containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. 2000;66(6):2578–88.
 44. Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, et al. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(March):488–96.
 45. Hatakka K, Holma R, El-nezami H, Suomalainen T, Kuisma M, Saxelin M. The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. *Int J Food Microbiol*. 2008;128(2):406–10.
 46. Worthley D. A human, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of prebiotic, probiotic, and synbiotic supplementation: effects on luminal, inflammatory, epigenetic, and epithelial biomarkers of colorectal cancer. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(3):578-86.
 47. Ohara T, Yoshino K, Masaki Kitajima M. Possibility of Preventing Colorectal Carcinogenesis with Probiotics. *Hepato-gastroenterology*. 2010;57(104):1411-5.
 48. Goldin B, Gorbach S. The relationship between diet and rat faecal bacterial enzymes implicated in colon cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1976;57:371–5.
 49. Cole C, Fuller R, Carter S. Effect of probiotic supplements of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium adolescentis* 2204 on b-glucosidase and b-glucuronidase activity in the lower gut of rats associated with a human faecal flora. *Microb Ecol Heal Dis*. 1989;2:223–5.
 50. Rowland I, Rumney C, Coutts J, LC L. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinog* 1989; 19 281-5. 1989;19:281–5.
 51. Goldin B, Swenson L, Dwyer J, Sexton M, Gorbach S. Effect of Diet and *Lactobacillus acidophilus* Supplements on Human Fecal Bacterial Enzymes. *J Natl Cancer Inst*. 1980;54(2):255–61.
 52. Goldin B, Gorbach S. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am J Clin Nutr*. 1984;39(5):756–61.
 53. Marteau P, Pochart P, Flourié B, Pellier P, Santos L, Desjeux J. Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. *Am J Clin Nutr*. 1990;52(4):685–8.
 54. Zhu Q, Gao R, Wu W, Qin H. The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. *Tumor Biol*. 2013;34:1285–300.
 55. Bolognani F, Rumney CJ, Rowland IR. Influence of carcinogen binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens. *Food Chem Toxicol*. 1997;35(6):535–45.

56. Pool-Zobel B, Neudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rumney C. Lactobacillus and Bifidobacterium media-ted antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr Cancer*. 1996;26(365–368).
57. Rowland I, Bearne C, Fischer R, Pool-Zobel B. The effect of lactulose on DNA damageinduced by DMH in the colon of human flora associated rats. *Nutr Cancer*, 26 (1996), pp. 37-47. *Nutr Cancer*. 1996;26(37–47).
58. Ernst M, Najdovska M, Grail D, Lundgren-May T, Buchert M, Tye H, Matthews VB, Armes J, Bhathal PS, Hughes NR, Marcusson EG, Karras JG, Na S, Sedgwick JD, Hertzog PJ, Jenkins BJ. STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric t.
59. Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y, Roy D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr Issues Mol Biol* 10: 37–54, 2008.
60. Nami Y, Abdullah N, Haghshenas B, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Probiotic potencial and bioterapeutic effects of newly isolejated vaginal Lactobacillus acidophilus 36 YL strain on cancer cells. *Anaerobe* 2014; 28: 29-36.
61. Elmadfa I, Meyer A, Nowak V, Hasenegger V, Putz P VR et al. European Nutrition and Health Report 2009. *Forum Nutr* 62 1–405, 2009. 2009;62:1–405.
62. Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly. An investigation on age-related immunological changes. *J Clin Immunol* 2001;21:264-71.
63. Perdigon G, Valdez JC, Rachid M. Antitumor activity of yoghurt. study of possible inmune mechanisms. *J Dairy Res* 1998;65: 129-38.
64. Marteau P, Vaerman JP, Dehennin JP, Bord S, Brassart D, Pochart P, et al. Effects of intrajejunal perfusion and chronic ingestion of Lactobacillus johnsonii strain La1 on serum concentrations and jejunal secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans. *Gastroentérologie Clin Biol*. 1997;21(4):293–8.
65. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on inmunity. *Am J Clin Nutr*. 2001;73:444–50.
66. Ogawa T, Asai Y, Tamai R, Makimura Y, Sakamoto H, Hashikawa S. Natural killer cell activities of synbiotic Lactobacillus casei spp. casei in conjunction with dextran. *Clin Exp Immunol*. 2006;143(1):103–9.
67. Soltan Dallal MM, Yazdi MH, Holakuyee M, Hassam ZM, Abolhassani M, Mahdavi M. Lactobacillus casei ssp. casei induced Th1 cytokine profile and natural killer cells activity in invasive ductal carcinoma bearing mice. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2012;11(2):183–9.
68. Malgorzata A, Urbanska AP, Prakash J, Bhahena S. Suppression of Tumorigenesis: Modulation of Inflammatory Cytokines by Oral Administration of Microencapsulated Probiotic Yogurt Formulation. 2010;2010:1–10.
69. Lee Y, Lee T. Enhancement in ex vivo pathogenic capacity of peritoneal leukocytes in mice by oral delivery of varius lactid-acid producing bacteria. *Curr Microbiol*. 2005;50(24–27).
70. Agah, Alizadeh A, Mosavi M, Ranji P, Khavari-Daneshvar H, Ghasemian F, et al. More Protection of Lactobacillus acidophilus Than Bifidobacterium bifidum Probiotics on Azoxymethane-Induced Mouse Colon Cancer. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2018. p. 1–8.
71. Wang J, Wu T, Fang X, Min W, Yang Z. Characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide produced by Lactobacillus plantarum JLK0142 isolated from fermented dairy tofu. *Int J Biol Macromol*. 2018 Aug 1;115:985–93.
72. Roller M, Clune Y, Collins K, Rechkemmer G, Watzl B. Consumption of prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis has minor effects on selected immune

- parameters in polypectomised and colon cancer patients. 2007;676–84.
73. Dasari S, Kathera C, Janardhan A, Praveen Kumar A, Viswanath B. Surfacing role of probiotics in cancer prophylaxis and therapy: A systematic review. *Clin Nutr*. 2017 Dec 1;36(6):1465–72.
 74. Dos Reis SA, da Conceição LL, Siqueira NP, Rosa DD, da Silva LL, Peluzio M do CG. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutr Res*. 2017 Jan 1;37:1–19.
 75. Jan G, Belzacq A, Haouzi D, Rouault A, Métivier D, Kroemer G et al. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death and Differentiation*. 2002;9(2):179-188.
 76. Le LRK, Brown IL, Hu Y, Bird AR, Jackson M, Esterman A, et al. A synbiotic combination of resistant starch and *Bifidobacterium lactis* facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. *J Nutr* 2005;135: 996e1001.
 77. Baldwin C, Millette M, Oth D, Ruiz M, Luquet F, Lacroix M. Probiotic *Lactobacillus Acidophilus* and *L. Casei* Mix Sensitize Colorectal Tumoral Cells to 5-Fluorouracil-Induced Apoptosis. *Nutrition and Cancer*. 2010;62(3):371-378.
 78. Cousin FJ, Jouan-Lanhouet S, Dimanche-Boitrel MT, Corcos L, Jan G. Milk fermented by *Propionibacterium freudenreichii* induces apoptosis of HGT-1 human gastric cancer cells. *PLoS One* 2012;7:31892.
 79. Iyer C, Kosters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kappa B and MAPK signalling. *Cell Microbiol* 2008;10:1442e52.
 80. Kulkarni N, Reddy BS. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane induced aberrant crypt foci formation and faecal bacterial β -glucuronidase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 207:278-83.
 81. Challa A, Rao DR, Chawan CB, Shackelford L. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 1997;18:517-21.
 82. Abdelali H, Cassand P, Soussorre V, Daubeze M, Bouley C, Narbonne JF. Effect of dairy products on initiation of precursor lesions of colon cancer in rats. *Nutr Cancer* 1995; 24:121.
 83. Foo N-P, Yang H, Chiu H-H, Chan H-Y, Liao C-C, C-K Y, et al. Probiotics prevent the development of 1,2 -dimethylhydrazine (DMH)-induced colonic tumorigenesis through suppressed colonic mucosa cellular proliferation and increased stimulation of macrophage. *J Agric Food Chem*. 2011;59(24):133337–45.
 84. Zhu J, Zhu C, Ge S, Zhang M, Jiang L, Cui J, et al. *Lactobacillus salivarius* Ren prevent the early colorectal carcinogenesis in 1, 2 dimethylhydrazine-induced rat model. *J Appl Microbiol* 2014;117:208–16.
 85. Melo AF de P, Mendonça MCP, Rosa-Castro R de M. The protective effects of fermented kefir milk on azoxymethane-induced aberrant crypt formation in mice colon. *Tissue Cell*. 2018;52:51–6.
 86. Gallaher DD, Stallings WH, Blessing LL, Busta FF, Brady LJ. Probiotics cecal microflora, and aberrant crypts in the rat colo. *J Nutr* 1996; 126:1362-71.
 87. Liu CT, Chu FJ, Chou CC, Yu RC. Antiproliferative and anticarcinogenic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01. *Mutat Res* 2011;721:157e62.
 88. Heshmati J, Farsi F, Shokri F, Rezaeinejad M, Almasi-Hashiani A, Vesali S, et al. A systematic review and meta-analysis of the probiotics and synbiotics effects on oxidative stress. *J Funct Foods*. 2018 Jul 1;46:66–84.
 89. Xu C, Qiao L, Guo Y, Ma L, Cheng Y. Preparation, characteristics and antioxidant activity of polysaccharides and proteins-capped selenium

- nanoparticles synthesized by *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydr Polym.* 2018 Sep 1;195:576–85.
90. Ohland CL, MacNaughton Wk. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298:807-819.
 91. Lobatón E. El intestino del paciente con Enfermedad Renal Crónica [Internet]. *eduardolobatonrd.* 2017. Available from: https://eduardolobatonrd.wordpress.com/2017/06/02/intestino-_renal_cronica/
 92. Weir TL, Manter DK, Sheflin AM, Barnett BA, Heuberger AL, Ryan EP. Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. *PLoS ONE* 2013; 8: 1-10.
 93. Kumar M, Nagpal R, Verma V, Kumar A, Kaur N, Hemalatha R, et al. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutr Rev* 2012; 71: 23–34.
 94. Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, Vidal A. Anti inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2826-32.
 95. Vinay Dubey A, Asit Ranjan Ghosh A, Kausik Bishayee B, Anisur Rahman Khuda-Bukhsh B. Appraisal of the anti-cancer potential of probiotic *Pediococcus pentosaceus* GS4 against colon cancer: in vitro and in vivo approaches. *J Funct Foods.* 2016;23:66–79.
 96. Pala V, Sieri S, Berrino F, Vineis P, Sacerdote C, Palli D et al. Yogurt consumption and risk of colorectal cancer in the Italian European prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *International Journal of Cancer.* 2011;129(11):2712-2719.
 97. Young T, Wolf D. Case-control study of proximal and distal colon cancer and diet in Wisconsin. *International Journal of Cancer.* 1988;42(2):167-175.
 98. Peters R, Pike M, Garabrant D, Mack T. Diet and colon cancer in Los Angeles County, California. *Cancer Causes and Control.* 1992;3(5):457-473.
 99. Kampman E, Van't Veer P, Hiddink G, Van Aken-Schneijder P, Kok F, Hermus R. Fermented dairy products, dietary calcium and colon cancer: A case-control study in the netherlands. *International Journal of Cancer.* 1994;59(2):170-176.
 100. Boutron M, Faivre J, Marteau P, Couillaud C, Senesse P, Quipourt V. Calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis: a French case - control study. *British Journal of Cancer.* 1996;74(1):145-151.
 101. Ayebo, A.D., Angelo, I.A., Shahani, K.M. Effect of ingesting *Lactobacillus acidophilus* milk upon fecal flora and enzyme activity in humans. *Milchwissenschaft.* 1980;35:730–733.
 102. Hayatsu H, Hayatsu T. Suppressing effect of *Lactobacillus casei* administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Cancer Letters.* 1993;73(2-3):173-179.
 103. Kearney J, Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Calcium, vitamin D, and dairy foods and the occurrence of colon cancer in men. *Am J Epidemiol.* 1996;143(9):907–17.
 104. Ishikawa H, Akedo I, Otani T, Suzuki T, Nakamura T, Takeyama I et al. Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. *International Journal of Cancer.* 2005;116(5):762-767.