

Prebióticos y probióticos en la prevención del cáncer de colon

A.J. Burns e I.R. Rowland

Northern Ireland Centre for Diet and Health. School of Biomedical Sciences. University of Ulster. Irlanda del Norte.

PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS

Según su definición original, un probiótico es un suplemento alimentario microbiano vivo que afecta beneficiosamente al animal huésped, mejorando su equilibrio microbiano intestinal¹. Las definiciones recientes son más generales, y omiten el aspecto del equilibrio intestinal. Por ejemplo, Salminen et al² definen un probiótico como «un ingrediente alimentario microbiano vivo que es beneficioso para la salud». Un microorganismo probiótico debe ser no patógeno y no tóxico y, asimismo, resistente a un pH bajo y a las sales biliares para mejorar sus probabilidades de sobrevivir en el tracto gastrointestinal³. La mayoría de los probióticos pertenece a dos géneros de bacterias productoras de ácido láctico (BAL), *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, pero también se utilizan *Saccharomyces* y *Enterococcus*. Muchas de las bacterias utilizadas para los preparados probióticos se han aislado a partir de muestras fecales humanas para maximizar la probabilidad de una compatibilidad con la microflora intestinal humana y, en consecuencia, mejorar sus posibilidades de supervivencia.

El concepto de probióticos evolucionó a partir de una teoría propuesta en primer lugar por Metchnikoff, que sugirió que la vida larga y sana de los campesinos búlgaros podría atribuirse al consumo de productos a base de leche fermentada. Diversos beneficios para la salud se han asociado a las BAL, como una mejora de la intolerancia a la lactosa, la regulación de la estasis gastrointestinal, resistencia a las enfermedades digestivas infecciosas, en especial la diarrea asociada a rotavirus en lactantes, y la inmunomodulación⁴.

Un prebiótico es un «ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped estimulando de

manera selectiva el desarrollo y la actividad de una o de un número limitado de bacterias del colon que tienen la posibilidad de mejorar la salud del huésped»⁵. En la categoría de prebióticos se incluye una serie de hidratos de carbono apenas digeridos, como ciertas fibras y almidones resistentes⁶, pero los prebióticos descritos más ampliamente son los oligosacáridos no digeribles (OND). Son hidratos de carbono de bajo peso molecular con 2-10 grados de polimerización, que apenas son digeridos en el intestino del ser humano, por lo que alcanzan el colon en su mayor parte sin haber sido modificados y actúan como cosustrato de la microflora colónica. Parecen estimular específicamente una serie de bifidobacterias y lactobacilos, a menudo a expensas de otros componentes de la microflora, como los bacteroides, clostridios y *E. coli*^{5,7}. La combinación de probióticos y prebióticos da lugar a efectos aditivos o sinérgicos sobre la función gastrointestinal. Para esta combinación se ha propuesto el término de simbiótico. Un simbiótico se ha definido como una mezcla de probióticos y prebióticos que afecta beneficiosamente al huésped, mejorando la supervivencia y la implantación de los suplementos dietéticos microbiano vivos en el tracto gastrointestinal al estimular selectivamente el desarrollo y activar el metabolismo de una o un número limitado de bacterias que potencian la salud y, por consiguiente, mejorar el bienestar del huésped⁵.

PAPEL DE LA FLORA INTESTINAL EN EL CÁNCER

El elevado número y la diversidad de la microflora intestinal humana se reflejan en su amplia y variada capacidad metabólica, en especial en relación con la biotransformación de xenobióticos, y la síntesis y activación de carcinógenos. Las actividades metabólicas de la microflora intestinal tienen implicaciones de gran alcance para la salud del huésped, dando lugar a efectos tanto beneficiosos como deletéreos^{8,9}.

Las pruebas a partir de una amplia serie de fuentes apoyan la opinión de que la microflora colónica interviene en la etiología del cáncer. Las pruebas principales son las que se mencionan más adelante:

Correspondencia: Dr. A.J. Burns.
Northern Ireland Centre for Diet and Health.
School of Biomedical Sciences. University of Ulster.
Coleraine BT52 1SA. Irlanda del Norte.

1. Se ha demostrado que las heces humanas son mutagénicas, y se han aislado sustancias genotóxicas de origen bacteriano¹⁰.
2. A partir de componentes dietéticos, las bacterias intestinales producen sustancias con una actividad genotóxica, carcinogénica y estimuladora tumoral⁹.
3. Las bacterias intestinales convierten procarcinógenos en agentes capaces de reaccionar con el ADN.
4. En ratas libres de flora tratadas con el carcinógeno 1,2-dimetilhidracina se identifica una menor incidencia de tumores de colon que en ratas tratadas de forma similar con una microflora normal¹¹.
5. En ratas libres de flora alimentadas con dietas humanas se detectan concentraciones menores de aductos de ADN en tejidos que en ratas convencionales¹².

De lo mencionado previamente se deduce que la modificación de la microflora intestinal interferiría con el proceso de carcinogénesis, y esto abre la posibilidad de plantear modificaciones dietéticas para reducir el riesgo de cáncer de colon. En este sentido, se ha prestado una especial atención a los probióticos y prebióticos, que modifican la microflora aumentando el número de lactobacilos y bifidobacterias en el colon. Las pruebas de que los probióticos y los prebióticos influyen en la carcinogénesis se derivan de una serie de fuentes:

1. Efectos sobre las actividades enzimáticas bacterianas.
2. Efectos antígenotóxicos *in vitro* e *in vivo*.
3. Efectos sobre lesiones precancerosas en animales de laboratorio.
4. Efectos sobre la incidencia tumoral en animales de laboratorio.
5. Estudios epidemiológicos y experimentales en seres humanos.
6. Efectos de los probióticos y prebióticos sobre las actividades enzimáticas bacterianas.

Está bien documentada la capacidad de la microflora colónica para generar una amplia variedad de mutágenos, carcinógenos y promotores tumorales a partir de precursores de la dieta y producidos endógenamente⁸. Por ejemplo, la enzima betaglucuronidasa participa en la liberación de una serie de carcinógenos dietéticos en el colon a partir de su forma conjugada, incluyendo los hidrocarburos aromáticos policíclicos. De forma similar, la betaglucosidasa bacteriana hidroliza el glucósido vegetal cicasina en un carcinógeno en el intestino. Sin embargo, es preciso destacar que la hidrólisis del glucósido por la microflora intestinal puede dar lugar a la generación de sustancias anticarcinógenas y antimutagénicas potenciales en forma de flavonoides, como la quercetina⁸. Se ha identificado un importante papel de la microflora intestinal en el metabolismo de los ácidos biliares ácido cólico y quenodesoxicólico en ácido desoxicólico y litocólico, que se considera que poseen una actividad estimuladora tumoral. Otros potenciales promotores tumorales, principalmente el amoníaco, los fenoles y cresoles, también se generan por desaminación de aminoácidos, como la tirosina, por bacterias intestinales.

La reacción del nitrito con aminas y amidas secundarias da lugar a la formación de sustancias *N*-nitroso, muchas de las cuales poseen actividad mutagénica y carcinogénica. A partir de estudios en ratas sin flora se dispone de pruebas de que la nitrosación se produce en condiciones de pH neutro mediante un proceso enzimático catalizado por las bacterias intestinales¹³. Otra reacción catalizada por bacterias que produce una sustancia reactiva capaz de provocar una lesión y mutaciones del ADN es la conversión del carcinógeno de los alimentos cocinados 2-amino-3-metil-3H-imidazo(4,5-*f*)quinolina (IQ) en su derivado 7-hidroxi. A diferencia de la sustancia original, este último es un mutágeno de acción directa¹⁴.

En general, las especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* se caracterizan por actividades reducidas de las enzimas que participan en la formación y el metabolismo de los carcinógenos, en comparación con otros anaerobios mayores del intestino, como bacteroides, eubacterias y clostridios¹⁵. Esto sugiere que el aumento de la proporción de BAL en el intestino modificaría, de manera beneficiosa, los valores de enzimas metabolizadoras de xenobióticos. Se han llevado a cabo estudios en animales de laboratorio y en seres humanos con el objetivo de adquirir mayores conocimientos sobre la forma en la que la administración de probióticos y prebióticos específicos afectaría al metabolismo de la microflora intestinal.

ESTUDIOS EN ANIMALES DE LABORATORIO

Los efectos de los probióticos y prebióticos sobre las enzimas bacterianas intestinales se han estudiado en animales con flora convencional y, asimismo, en ratas sin flora asociadas a microflora fecal humana, las llamadas ratas «asociadas a flora humana» (AFH). Estos estudios se resumen en la tabla I^{7,16-20} y más adelante se describen algunos ejemplos con detalle.

En un estudio en ratas convencionales, los suplementos de una dieta rica en carne (un 72% de buey) con *L. acidophilus* (10^9 - 10^{10} microorganismos/día) disminuyeron significativamente en un 40-50% la actividad de la β -glucuronidasa y nitrorreductasa fecales¹⁶. Es interesante destacar que el efecto modulador de la cepa de *Lactobacillus* dependió del tipo de dieta basal, y no se observaron efectos significativos cuando las ratas fueron alimentadas con una dieta basada en cereales. En un estudio análogo en ratas AFH, Cole et al¹⁷ demostraron una disminución significativa de las actividades de β -glucuronidasa y β -glucosidasa cuando fueron alimentadas con *L. acidophilus* durante 3 días, persistiendo el efecto durante 7 días después de interrumpir la dosis.

Estos cambios de las actividades enzimáticas observados después del consumo de BAL en teoría darían lugar a cambios en las tasas de metabolismo de sus sustratos *in vivo*, aunque sólo si las enzimas catalizaran el paso limitante de la velocidad en su metabolismo. Goldin y Gorbach¹⁸ lo han confirmado poniendo de manifiesto que la disminución de la actividad de las enzimas bacterianas nitrorreductasa, azorreductasa y β -glucuronidasa en ratas a

TABLA I. Efectos de los probióticos y prebióticos sobre la actividad enzimática bacteriana y productos de desecho metabólico en animales de laboratorio

Especie	Criterio de valoración	Probiótico/prebiótico	Resultado	Autor
Ratas F344	β -glucuronidasa fecal	<i>L. acidophilus</i> (10^9 - 10^{10} células/día)	Disminución de la actividad de β -glucuronidasa en un 40-50%	Goldin y Gorbach (1976) ¹⁶
Ratas Lister (HFA)	Actividad de β -glucuronidasa y β -glucosidasa	<i>L. acidophilus</i> o <i>B. adolescentis</i> (10^9 células/día durante 3 días)	Disminución significativa de la actividad enzimática sólo para <i>L. acidophilus</i>	Cole et al (1989) ¹⁷
Ratas F344	Valores fecales de productos de reacción enzimática después de la administración de sustancias de prueba	<i>L. acidophilus</i>	En animales que recibieron <i>L. acidophilus</i> se identificó un número significativamente menor de aminas libres en heces un 50% menos de conjugados	Goldin y Gorbach (1984) ¹⁸
Ratas	Valores fecales de ácidos grasos de cadena corta	Neosugar (10-20% en la dieta)	Aumento significativo de la concentración de ácidos grasos de cadena corta en heces	Tokunga et al (1986) ¹⁹
Ratas Lister sin flora	Diversas enzimas fecales	TOS (5% p/p en la dieta durante 4 semanas) o TOS + <i>B. breve</i>	En el contenido fecal de ratas alimentadas con TOS disminución significativa de las actividades de β -glucuronidasa y nitrato reductasa, pH y conversión de IQ en 7-OHIQ. En ratas alimentadas con TOS aumento de la actividad de β -glucosidasa bacteriana	Rowland y Tanaka (1993) ⁷
Ratas macho Sprague-Dawley	Enzimas y amoníaco fecal	<i>B. longum</i> (liofilizado) e inulina (5%)	Disminución significativa de β -glucuronidasa y amoníaco. El probiótico más el prebiótico fue más eficaz	Rowland et al (1998) ²⁰

las que se administraron lactobacilos orales se correspondió con una disminución (de alrededor del 50% en comparación con animales de control) en la excreción en heces de los productos de reacción de estas enzimas.

Los estudios sobre la influencia de OND en las actividades enzimáticas bacterianas intestinales en animales de laboratorio se han concentrado en los fructooligosacáridos y galactooligosacáridos. En ratas con flora convencional alimentadas con una dieta purificada que contenía tirosina y triptófano, la incorporación de un fructooligosacárido («Neosugar») en la dieta a una concentración del 0,4-10% redujo la concentración fecal de *p*-cresol, producto potencialmente promotor de tumores²¹. El efecto guardó relación con la dosis del OND. Se puso de manifiesto que concentraciones dietéticas más elevadas de Neosugar (de hasta un 20%) aumentaron los ácidos grasos de cadena corta y la excreción diaria total de esteroides neutros y ácidos²².

Se estudió el efecto del consumo de oligosacáridos transgalactosilados (TOS; 5% por partes en la dieta durante 4 semanas) con o sin *B. breve* en ratas AFH⁷. En animales alimentados con TOS se identificó un aumento del número de bifidobacterias y lactobacilos en el ciego, asociado a disminuciones significativas de las actividades de β -glucuronidasa y nitrato reductasa, del pH y la conversión de IQ en su derivado directamente genotóxico 7-OHIQ. La actividad de β -glucosidasa bacteriana aumentó supuestamente como consecuencia del elevado número de BAL con una actividad elevada de esta enzima. No se detectaron pruebas de efectos aditivos o sinérgicos del consumo de *B. breve* sobre las actividades enzimáticas. En com-

paración, en un estudio reciente de Rowland et al²⁰ en ratas a las que se administró *B. longum*, inulina o ambas, se describió un mayor efecto de la combinación simbiótica sobre las actividades enzimáticas y los metabolitos bacterianos fecales. Por ejemplo, la alimentación con *B. longum* dio lugar a una disminución del 30% de la actividad de β -glucuronidasa, mientras que en ratas a las que se administraron suplementos dietéticos con la combinación probiótico/prebiótico se identificó una disminución del 55%.

ESTUDIOS EN SERES HUMANOS

Se ha llevado a cabo una serie de estudios sobre los efectos de los probióticos, prebióticos y simbióticos en seres humanos que han incluido la determinación de las actividades enzimáticas bacterianas (tabla II)^{18,21,23-27,29}. Goldin y Gorbach²² estudiaron a individuos voluntarios que consumieron leche suplementada con 10^9 lactobacilos viables al día. Antes de la alimentación con lactobacilos, la actividad fecal de β -glucuronidasa fluctuó entre 1,7 y 2,1 unidades. En los 21 individuos disminuyó después del consumo de lactobacilos hasta un valor medio de 1,1 unidades. La actividad recuperó los valores basales 10 días después de haber cesado el consumo de BAL. Lidbeck et al²³ suplementaron las dietas de 14 pacientes con cáncer de colon con *L. acidophilus* como un producto a base de leche fermentada (aproximadamente 3×10^{11} lactobacilos al día) durante un período de 6 semanas, determinando la microflora fecal, los ácidos biliares fecales y la actividad de β -glucuronidasa. Coincidiendo con los cambios de la microflora (aumento de lactobacilos en heces y dis-

TABLA II. Efectos de los probióticos y prebióticos sobre la actividad enzimática bacteriana y productos de desecho metabólico en el ser humano

Individuos	Criterio de valoración	Probiótico/prebiótico	Resultado	Autor
21 individuos sanos	Actividades enzimáticas fecales	Leche suplementada con <i>Lactobacillus acidophilus</i> (1×10^9 bacterias viables al día)	Disminución de la actividad de β -glucuronidasa fecal desde 1,7-2,1 unidades hasta 1,1 unidades en todos los individuos	Goldin y Gorbach ⁸ (1984a) ¹⁸
Pacientes ancianos	<i>p</i> -cresol fecal	Neosugar (8 g/día durante 14 días)	Aumento de 10 veces en bifidobacterias	Hidaka et al (1986) ²¹
14 pacientes con cáncer de colon	Actividad de β -glucuronidasa fecal	<i>L. acidophilus</i> (administrado) como producto fermentado entre $1,5 \times 10^{11}$ y 6×10^{11} UFC/día)	Disminución del 14% en la actividad media de β -glucuronidasa después de 2 semanas	Lidbeck et al (1991) ²³
20 varones sanos (40-65 años de edad)	Actividad β -glucuronidasa y β -glucosidasa fecal	<i>L. casei</i> (cepa Shirota) 3×10^{11} UFC/día)	Disminución significativa de la actividad de β -glucuronidasa y β -glucosidasa ($p < 0,05$)	Spanhaak et al (1998) ²³
9 adultos sanos	β -galactosidasa, β -glucosidasa y β -glucuronidasa fecal	Olifus (leche fermentada comercial con <i>L. acidophilus</i> [3×10^9 bacteria/día] cepa A1, <i>B. bifidum</i> B1 [3×10^{10} bacteria/día], <i>Streptococcus lactis</i> y <i>S. cremoris</i> [3×10^{10} bacteria/día])	No se identificó un cambio de β -galactosidasa y β -glucuronidasa fecal. Aumento significativo de la actividad de β -glucosidasa	Marteau et al (1990) ²⁵
3 varones y 9 mujeres sanos	Actividad β -glucosidasa y β -glucuronidasa fecal	Digest TM con <i>L. acidophilus</i> viable (cepa DDS1) (3 vasos de 250 ml) de leche con 2×10^6 UFC/ml al día)	Disminución de la actividad de β -glucuronidasa y 3 β -glucosidasa	Ayebo et al (1980) ²⁶
21 mujeres jóvenes de 21-35 años de edad	Actividades de 19 enzimas fecales	<i>L. acidophilus</i> y <i>B. bifidum</i> (1×10^9 de cada tipo de bacteria/cápsula/3 al día)	Disminución de la actividad de 3 β -glucosidasa. Disminución de la actividad de β -glucuronidasa	Bertazzoni-Minelli et al (1996) ²⁷
Individuos voluntarios	Recuento de bacterias viables	Oligosacáridos de la soja (SOE) 10 g/día	No se identificaron diferencias significativas en los niveles de <i>p</i> -cresol, indol o fenol entre los diversos períodos de dieta	Hayakawa et al (1990) ²⁹

minución del número de *E. coli*) se identificó una disminución del 14% de la actividad de β -glucuronidasa. También se observó una disminución de los ácidos biliares totales y de ácido desoxicólico del 15 y 18%, respectivamente. Spanhaak et al²⁴ obtuvieron resultados similares mencionando una disminución significativa de la actividad de β -glucuronidasa y β -glucosidasa fecales en un grupo de 20 varones sanos a los que administraron *L. casei* (aproximadamente 10^{11} UFC/día durante 4 semanas como período de prueba).

Marteau et al²⁵ estudiaron a 9 individuos voluntarios sanos antes (período 1), durante (período 2) y después (período 3) del consumo de 100 g/día de un producto a base de leche fermentada («Olifus») que contenía *L. acidophilus* (10^7 UFC/g), *B. bifidum* (10^8 UFC/g), *Streptococcus lactis* (10^8 UFC/g) y *Streptococcus cremoris* (10^8 UFC/g) durante 3 semanas. Durante los 3 períodos no se modificaron las actividades de azorreductasa y β -glucuronidasa fecales. En el período 2 disminuyó significativamente la actividad de nitrato reductasa, cuyos valores siguieron siendo bajos durante el período 3. No se identificó ningún cambio de la actividad de β -galactosidasa, pero la actividad de β -glucosidasa aumentó significativamente en el período 2 y recuperó los valores basales en el período 3. *In vitro*, el producto lácteo manifestó una elevada actividad β -glucosidasa que se relacionó con la presencia de *B. bifidum*. La disminución de la actividad de nitrato reductasa seguía persistiendo 3 semanas después de cesar el consumo del producto a base de leche fermentada, lo que sugirió modificaciones más prolongadas de la flora colónica.

Ayebo et al²⁶ evaluaron el efecto del consumo de leche no fermentada con *Lactobacillus acidophilus* (2×10^6 UFC/ml) sobre β -glucuronidasa y β -glucosidasa fecales

en un estudio cruzado en individuos de edad avanzada. Como control se administró leche desnatada y las dietas se siguieron durante un período de 4 semanas. Los recuentos fecales de lactobacilos aumentaron durante el período de consumo de probióticos en aproximadamente un orden de magnitud. La actividad de β -glucuronidasa disminuyó ligeramente después de 4 semanas de consumo de *Lactobacillus*. Se hicieron evidentes inconsistencias en la actividad de β -glucosidasa porque la actividad disminuyó desde 0,9 unidades hasta 0,45 unidades durante un período de exposición, mientras que durante el otro no se identificó ningún cambio de actividad.

En un estudio de mujeres jóvenes con síndrome de tensión premenstrual, Bertazzoni-Minelli²⁷ puso de manifiesto que el consumo de *L. acidophilus* y *B. bifidum* liofilizados (1×10^9 de cada tipo de bacteria/cápsula) se asoció con sólo cambios menores de β -glucosidasa y ningún efecto significativo sobre β -glucuronidasa.

A partir de los estudios en seres humanos, apenas se dispone de pruebas de los efectos de los prebióticos y simbióticos sobre los metabolitos bacterianos tóxicos en heces y, en general, los estudios han producido resultados inconsistentes o negativos. Tanaka et al²⁸ no describieron ningún efecto de TOS (3 o 10 g/día) sobre el amoníaco fecal, pero pusieron de manifiesto que el consumo simultáneo de TOS y *B. breve* redujo la concentración de amoníaco en 4 de 5 individuos.

Un estudio en individuos voluntarios que consumieron oligosacáridos a partir de la soja (10 g/día), con o sin el consumo simultáneo de *B. breve*, no demostró efectos significativos sobre el pH fecal o los productos de degradación de aminoácidos (*p*-cresol, fenol e indol) a pesar de los cambios en el número de bifidobacterias fecales²⁹.

TABLA III. Antigenotoxicidad de los probióticos y prebióticos *in vitro* e *in vivo*

Objetivo	Criterio de valoración	Mutágeno	Prebiótico/probiótico	Resultado	Autor
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98	Mutagenicidad <i>in vitro</i> (Ames)	Trp-P-1, trp-P-2 y Glu-P-1	Bacterias productoras de ácido láctico aisladas a partir de un queso chino tradicional	Las células liofilizadas de todas las cepas inhibieron la mutagenicidad de Trp-P-1 y Trp-P-2. Algunas cepas inhibieron Glu-P-1	Zhang et al (1990) ³⁰
<i>S. typhimurium</i> TA 1538	Mutagenicidad <i>in vitro</i> (Ames)	Extracto de buey nitrosado	10 cepas aisladas de <i>Lactobacillus</i>	<i>L. casei</i> y <i>L. lactis</i> inhibieron mutación en > 85%; <i>L. sakei</i> y <i>L. confusus</i> carecieron de efecto	Pool-Zobel et al (1993) ³¹
<i>S. typhimurium</i>	Mutagenicidad <i>in vitro</i> (Ames)	Glu-P-1, Glu-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2	22 cepas de bacterias intestinales	La mayoría de las cepas inhibió la mutagenicidad	Morotomi et al (1986) ³²
<i>S. typhimurium</i> TA 100 y TA97	Mutagenicidad <i>in vitro</i> (Ames)	Nitrovina y 2-aminofluoreno	9 cepas de BAL	Actividad antigenotóxica significativa ejercida por 6 de 9 cepas	Ebringer et al (1995) ³³
Ratones BALB/c hembra de 4 semanas de edad	Unión <i>in vitro</i> y mutagenicidad en el hígado <i>in vivo</i>	B(a)P, AFB1, IQ, MeIQx, PhIP y Trp-P-2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Bifido bacterium longum</i>	Estas cepas se unen a los carcinógenos <i>in vitro</i> . Sin efecto sobre la mutagenicidad o absorción <i>in vivo</i>	Bolognani et al (1997) ³⁴
Ratas Sprague-Dawley macho	Lesión ADN <i>in vivo</i> en el colon (Cometa)	MNNG y DMH	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. confusus</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>L. acidophilus</i>	La mayor parte de BAL examinadas inhibió de forma potente la genotoxicidad en el colon. <i>S. thermophilus</i> sin efecto. El tratamiento con calor abolió el efecto probiótico	Pool-Zobel et al (1996) ³⁵
Ratas F344 (asociadas a flora humana)	Lesión ADN <i>in vivo</i> en el colon (Cometa)	DMH	Lactulosa (3% en la dieta)	La lactulosa redujo las lesiones en el ADN (p < 0,05)	Rowland et al (1996) ³⁶

ANTIGENOTOXICIDAD DE LOS PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Evaluando la capacidad de cultivos para prevenir la lesión y mutaciones del ADN (que se considera un acontecimiento temprano en el proceso de carcinogénesis) en cultivos celulares o en animales se han obtenido pruebas más directas de las propiedades protectoras de los probióticos y prebióticos frente al cáncer (tabla III)³⁰⁻³⁶.

El efecto de BAL sobre la inducción de mutaciones mediante una amplia variedad de carcinógenos *in vitro* se ha estudiado utilizando la prueba de Ames. Los carcinógenos utilizados incluyen las sustancias N-nitrosas N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) y N-metilnitrosourea (MNU), aminas heterocíclicas (p. ej., IQ y sustancias relacionadas) y aflatoxina B1. En conjunto, los resultados indican que diversas BAL inhiben la genotoxicidad de los carcinógenos dietéticos *in vitro*. El grado de inhibición dependió potentemente de la especie. Por ejemplo, Pool-Zobel et al³¹ demostraron que *L. casei* y *L. lactis* inhibieron la actividad mutagénica de las sustancias nitrosadas de la carne de buey en más de un 85%, mientras que *L. confusus* y *L. sakei* carecieron de efecto.

Parece probable que estos resultados, junto con resultados similares de otros investigadores, sean consecuencia de la unión de los mutágenos por las BAL^{34,37}. Es cuestionable si *in vivo* interviene un mecanismo de este tipo, ya que la unión parece ser altamente dependiente del pH y se invierte fácilmente y no parece afectar a la captación de carcinógenos a partir del intestino, ni produciría un efecto aparente sobre la mutagenicidad *in vivo* en el hígado³⁴.

Utilizando la técnica de electroforesis en microgel de célula única (prueba Cometa), Pool-Zobel et al³⁵ investigaron la capacidad de una serie de especies de BAL para in-

hibir la lesión del ADN en la mucosa del colon de ratas tratadas con los carcinógenos MNNG o 1,2-dimetilhidracina (DMH). Todas las cepas de lactobacilos y bifidobacterias examinadas –*L. acidophilus* (aisladas a partir del yogur), *L. gasseri*, *L. confusus*, *B. breve* y *B. longum*– previnieron la lesión del ADN inducida por MNNG cuando se administraron a una dosis de 10¹⁰ células/kg de peso corporal, 8 h antes del carcinógeno. En la mayoría de los casos, la lesión del ADN se redujo hasta un nivel similar al de ratas no tratadas. *Streptococcus thermophilus* no fue tan eficaz como las otras cepas de BAL.

El efecto protector fue dependiente de la dosis: dosis de *L. acidophilus* que representaron un 50 y un 10% de la dosis original fueron menos eficaces en la disminución de la lesión del ADN inducida por MNNG. Y lo que es más importante todavía, el tratamiento por calor de *L. acidophilus* abolió su potencial antigenotóxico, lo que indica la importancia de las células viables. Se obtuvieron resultados similares cuando se examinaron cepas BAL en ratas a las que se administró DMH como agente lesionante de ADN. Una vez más, todos los lactobacilos y bifidobacterias inhibieron potentemente la lesión del ADN en la mucosa del colon, mientras que *S. thermophilus* fue mucho menos eficaz. Se identificaron pruebas de diferencias de cepa en los efectos antigenotóxicos: de las tres cepas de *S. thermophilus*, dos no fueron eficaces y una manifestó protección frente a la lesión del ADN.

La prueba Cometa también ha sido utilizada para evaluar el efecto de un prebiótico, la lactulosa, sobre la lesión del ADN en la mucosa del colon. Las ratas a las que se alimentó con una dieta que contenía un 3% de lactulosa y a las que se administró DMH manifestaron una menor lesión del ADN en las células del colon que animales tratados de forma similar alimentados con una dieta a base de

TABLA IV. Efectos de los probióticos/prebióticos y simbióticos sobre focos de criptas aberrantes colónicas en animales de laboratorio

Especie	Carcinógeno	Probiótico/prebiótico	Estadio*	Resultado	Autor
Ratas F344 macho	AOM (s.c.)	<i>B. longum</i> liofilizado (1,5% y 3% dieta)	Iniciación y promoción	Inhibición significativa de FCA totales ($p < 0,01$) Disminución significativa en CA totales por colon ($p < 0,001$)	Kulkarni et al (1994) ³⁸
Ratas F344 macho	AOM (s.c.)	<i>B. longum</i> ($B, 1 \times 10^8$ células/g de alimento, ratas alimentadas a voluntad), lactulosa (L, 2,5%) o ambas (B + L)	Iniciación y promoción	Disminución significativa de FCA en ratas alimentadas con B, L, B + L ($p = 0,05$). En ratas alimentadas con B + L se identificó un número significativamente menor de FCA que en las que consumieron B o L solas	Challa et al (1997) ³⁹
Ratas F344 macho	DMH (i.p.)	<i>Bifidobacterium</i> (6×10^9 células/animal/día) en suspensión de células, o leche fermentada. Polvo de leche desnatada	Iniciación y promoción	Inhibición significativa ($p < 0,05$) de CA: 61% (<i>Bifidobacterium</i>), 51% (leche desnatada) y 49% (leche fermentada)	Abdelali et al (1995) ⁴⁰
Ratas Sprague-Dawley	AOM (s.c.)	<i>B. longum</i> (4×10^8 células viables/g de dieta) o inulina (5% v/v dieta)	Promoción	Disminución de FCA totales en un 74% en ratas tratadas con probiótico + prebiótico (efecto simbiótico). Disminución significativa del número de FCA extensos (> 4 CA por foco) ($p < 0,05$) en un 59% en ratas alimentadas con probiótico + prebiótico	Rowland et al (1998) ²⁰
Ratas Wistar macho	DMH (pienso)	Leche desnatada, leche desnatada + bifidobacterias (10^9 /día), leche desnatada + fructo-oligosacárido y leche desnatada + bifidobacterias + fructooligosacárido; <i>L. acidophilus</i> (10^8)	Promoción	Resultados inconsistentes	Gallaher et al (1996) ⁴¹
Ratas F344 macho destetadas	AOM (s.c.)	Inulina (10%) en la dieta	Iniciación y promoción	Sin efecto significativo sobre FCA pero disminución número de CA/cm ²	Rao et al (1998) ⁴²
Ratas F344	AOM (s.c.)	<i>L. acidophilus</i> NCFMTM (lioofilizadas) en la dieta	Iniciación y promoción	Supresión significativa de FCA colónicas	Rao et al (1999)
Ratas F344 macho	AOM (s.c.)	Oligofruktosa (10%) o inulina (10%) en la dieta	Iniciación y promoción	Inhibición significativa de FCA/colon –más pronunciada para inulina ($p < 0,0006$) que para oligofruktosa ($p < 0,02$). Multiplicidad criptas también inhibida en animales alimentados con inulina ($p < 0,02$) u oligofruktosa ($p < 0,04$)	Reddy et al (1997) ⁴³

*El protocolo de «iniciación y promoción» incluye la alimentación con un probiótico durante alrededor de una semana seguido de la administración del carcinógeno y a continuación readministración del probiótico hasta el sacrificio de los animales antes de evaluar los focos de criptas aberrantes (FCA). En el protocolo «promoción», se administra el carcinógeno a los animales antes del tratamiento con el probiótico.
AOM: azoximetano; DMH: 1,2-dimetilhidracina.

sacarosa. En estos últimos animales, el porcentaje de células con una lesión severa del ADN incluyó un 33% del total, comparado con sólo un 12,6% en ratas alimentadas con lactulosa³⁶.

Los resultados mencionados previamente proporcionan pruebas de que tanto las BAL como los prebióticos producirían efectos protectores frente a los estadios precoces del cáncer de colon.

EFFECTO DE LOS PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS SOBRE LAS LESIONES PRECANCEROSAS EN ANIMALES DE LABORATORIO (tabla IV)^{20,38-43}

Las criptas aberrantes (CA) son lesiones preneoplásicas observadas en el colon de roedores tratados con carcinógenos. En numerosos casos se observan focos con dos o más criptas a los que se denomina focos de criptas aberrantes (FCA). Las criptas aberrantes son inducidas en la mucosa colónica de ratas y ratones mediante un tratamiento con diversos carcinógenos del colon como azoximetano (AOM), DMH e IQ. El hallazgo de un número significativamente mayor de FCA con cuatro o más criptas en ratas con tumores, comparado con los animales sin

tumores, sugiere que los FCA grandes son predictores de la incidencia de tumor en un estadio más avanzado⁴⁴. Los estudios han utilizado diversos regímenes de tratamiento con diferencias en la secuencia de exposición al carcinógeno y al probiótico/prebiótico, lo que permite que se extraigan conclusiones sobre el estadio afectado de la carcinogénesis. En la mayoría de los estudios, el protocolo incluyó la alimentación con el probiótico durante aproximadamente una semana, seguido de la administración del carcinógeno y acto seguido la administración continuada del probiótico hasta que se sacrificó a los animales previamente a la evaluación de los FCA. Por consiguiente, el tratamiento probiótico comprendió los estadios tanto de iniciación como de promoción precoz. En el protocolo «promoción», las ratas recibieron el carcinógeno antes del tratamiento probiótico.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO PROBIÓTICO SOLO

Se han llevado a cabo diversos estudios utilizando AOM o DMH para determinar los efectos de probióticos específicos sobre la formación de FCA. Kulkarni et al³⁸ describieron una inhibición en la formación de FCA de alrede-

durante 5 semanas y a las que se inyectó AOM s.c. una vez a la semana durante 2 semanas. Puesto que los tratamientos dietéticos se iniciaron 5 semanas antes de la administración del carcinógeno, los resultados no permiten hacer deducciones sobre el estadio afectado de la carcinogénesis. No se detectaron diferencias entre los animales alimentados con dietas con un 1,5 y 3% de *B. longum*.

Challa et al³⁹ llevaron a cabo un estudio similar observando una disminución del 23% en los FCA colónicos totales y una disminución del 28% de las CA totales en ratas alimentadas con una dieta que contenía un 0,5% de *B. longum* (1×10^8 células viables/g de alimento). Los animales fueron alimentados con la dieta experimental antes del tratamiento con AOM y durante todo el experimento.

Abdelali et al⁴⁰ compararon los efectos de *Bifidobacterium* spp. administrado en la dieta y, asimismo, como un producto a base de leche fermentada. Las cantidades de microorganismos consumidos fueron similares (6×10^9 células/día). Se administró DMH 4 semanas después de las BAL y los segundos tratamientos continuaron durante 4 semanas adicionales antes de la evaluación de FCA. Las bifidobacterias dietéticas fueron ligeramente más eficaces en la reducción de los FCA que la leche fermentada con bifidobacterias (disminución del 61 y el 49%, respectivamente). Sin embargo, es interesante destacar que la leche desnatada sola redujo en un 51% el número de FCA.

En un estudio sobre *B. longum* (6×10^9 UFC/día) en ratas Sprague Dawley tratadas con AOM, Rowland et al²⁰ demostraron una disminución significativa del 26% en los FCA totales en comparación con animales de control. Los cambios sólo se observaron en FCA pequeños (1-3 CA por foco). Puesto que el tratamiento con probióticos se inició una semana después de la exposición al carcinógeno, los resultados indican un efecto sobre la fase promocional precoz de la carcinogénesis. No todos los estudios sobre FCA con probióticos han deparado efectos positivos. Gallaher et al⁴¹, que utilizaron un protocolo de «promoción» con *B. longum* y *Lactobacillus acidophilus*, obtuvieron resultados inconsistentes que atribuyeron a diferencias en las edades de las ratas cuando se administró DMH.

TRATAMIENTOS PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS EN LA PREVENCIÓN DE FCA

Los prebióticos solos parecen producir resultados inconsistentes en la prevención de FCA inducidos por carcinógenos, que en parte serían consecuencia de diferencias en el carcinógeno y en los regímenes de tratamiento utilizados. Por ejemplo, Rao et al⁴² documentaron que la inulina (10% en la dieta) careció de efecto significativo sobre los FCA totales en el colon, o su multiplicidad, en ratas F344, aunque curiosamente se describió una disminución significativa de los FCA/cm² del colon. El estudio de Gallaher et al⁴¹ sobre *Bifidobacterium* spp. y SOF (2% en la

dieta) produjo resultados inconsistentes, demostrando sólo uno de tres experimentos una disminución de los FCA inducidos por DMH. Las diferencias en la dosis de SOF y los regímenes de tratamiento con carcinógeno serían responsables de la discrepancia entre este estudio y los de Challa et al³⁹ y Rowland et al²⁰.

Reddy et al⁴³ compararon oligosacáridos de cadena corta (FOS) y cadena larga (inulina) incorporados a una concentración del 10% en la dieta en los FCA inducidos por AOM en ratas. Antes del tratamiento con carcinógenos, al igual que durante todo el experimento, se administraron OND y se describieron disminuciones significativas de aproximadamente un 25 y un 35%, respectivamente, en los FCA totales. Las disminuciones observadas correspondieron casi por completo a los FCA más pequeños (< 3 CA por foco) y la inhibición por inulina pareció más pronunciada que para FOS.

Rowland et al²⁰ obtuvieron resultados similares describiendo una disminución del 41% en los FCA pequeños cuando se administró inulina (concentración del 5% en la dieta) una semana después de una dosis de AOM. No se observó ningún efecto de la inulina sobre FCA grandes. Challa et al³⁹ demostraron una pequeña disminución (22%) de los FCA totales en ratas F344 tratadas con AOM cuando se incorporó a la dieta a una concentración del 2% un disacárido sintético no digerible, la lactulosa. Tanto Challa et al³⁹ como Rowland et al estudiaron el efecto del tratamiento combinado con probióticos y prebióticos sobre el número de FCA. La combinación de *B. longum* y lactulosa dio lugar a una disminución del 48% de los FCA colónicos, que fue significativamente mayor que la obtenida con *B. longum* o lactulosa solas³⁹. De forma similar, Rowland et al describieron una disminución de los FCA totales del 74% en ratas tratadas con *B. longum* e inulina (en comparación con una disminución del 29 y 21% obtenida con *B. longum* o inulina solas). Es importante destacar que la administración combinada de probióticos y prebióticos redujo los FCA grandes en un 5%, mientras que los tratamientos individuales carecieron de efecto²⁰.

EFFECTO DE LOS PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS EN LA INCIDENCIA TUMORAL EN ANIMALES DE LABORATORIO (tabla V)⁴⁵⁻⁴⁸

Goldin y Gorbach⁴⁵ investigaron el efecto de *L. acidophilus* sobre la incidencia de tumores de colon en ratas tratadas con DMH. En animales tratados con *L. acidophilus* después de 20 semanas fue evidente una disminución de la incidencia de cáncer de colon (40 frente a 77% en animales de control), pero no se identificó una diferencia a las 36 semanas, lo que sugiere que los lactobacilos aumentaron el período de latencia, o tiempo de inducción, para los tumores.

La administración de *B. longum* (0,5% de *B. longum* liofilizado en la dieta, 1×10^{10} células bacterianas vias/día) inhibió significativamente la formación de tumores de colon e hígado inducidos por IQ y la multiplicidad (tumores/animal) de tumores de colon, hígado e intestino

TABLA V. Efecto de los probióticos y prebióticos sobre la incidencia tumoral en animales de laboratorio

Especie	Criterio de valoración	Carcinógeno	Probiótico/prebiótico	Resultado	Autor
Ratas F344	Incidencia de tumores de colon	DMH	<i>L. acidophilus</i>	Menor incidencia de tumores de colon en animales alimentados con el probiótico (40% frente al 77% en animales de control)	Goldin y Gorbach (1980) ⁴⁵
Ratas F344	Tumores de colon, hígado y mama (incidencia y multiplicidad)	IQ en la dieta	<i>B. longum</i> (1×10^{10} células bacterianas vivas en la dieta)	Supresión de tumores de colon ($p < 0,05$), hígado ($p < 0,05$) e incidencia NS tumores de mama	Reddy et al (1993) ⁴⁶
Ratones C57BL/CJ- <i>Min</i> /+	Incidencia de tumores de colon	N/A	Fructooligosacáridos de cadena corta (5,8%)	Disminución significativa de tumores de colon ($p < 0,01$)	Pierre et al (1997) ⁴⁷
Ratas macho F344	Incidencia y multiplicidad de tumores de colon	DMH (s.c.)	<i>Lactobacillus</i> GG ($2-4 \times 10^{10}$ microorganismos/día)	Menor incidencia de tumores de colon ($p < 0,012$) y multiplicidad de tumores ($p < 0,001$) cuando las ratas recibieron LGG durante todo el experimento. Ausencia de efecto cuando LGG se administró después de DMH	Goldin et al (1996) ⁴⁸

DMH: 1,2-dimetilhidracina; IQ: 2-amino-3-metil-3-H-imidazol(4,5- β quinolina.

TABLA VI. Efecto de los probióticos y prebióticos sobre el cáncer en estudios epidemiológicos en seres humanos

Individuos	Tipo de cáncer	Probiótico/prebiótico	Resultado	Autor
289 individuos de control y 133 casos de cáncer de mama	Cáncer de mama	Productos a base de leche fermentada (yogur, suero de leche, kefir)	El consumo de leche fermentada (> 225 g/día) redujo la <i>odds ratio</i> hasta 0,5	Van't Veer et al (1989) ⁴⁹
182 varones y 245 mujeres de control y 109 varones y 62 mujeres con cáncer	Adenomas de colon de pequeño y gran tamaño y cáncer de colon	Consumo de yogur	Relación inversa del consumo de yogur (0,5-1/día) con el riesgo de grandes adenomas en varones y mujeres	Boutron et al (1996) ⁵⁰
152 pacientes con cáncer de colon proximal, 201 con cáncer de colon distal y 618 individuos de control de la población general	Cáncer de colon	Consumo de leche fermentada	Asociación inversa del cáncer de colon con el consumo de leche fermentada	Young y Wolf (1988) ⁵¹
746 pacientes con cáncer de colon y 746 individuos de control	Cáncer de colon	Yogur	Efecto protector frente al cáncer de colon	Peters et al (1992) ⁵²
331 varones y 350 mujeres con pólipos adenomatosos de colon/recto e individuos de control (9.159 varones y 8.585 mujeres)	Adenomas colorrectales	Productos lácteos fermentados	Asociación inversa (no significativa) entre el consumo de yogur y los adenomas en varones y mujeres	Kampmann et al (1994a) ⁵³
232 pacientes con cáncer de colon y 259 individuos de control	Adenocarcinoma de colon	Productos lácteos fermentados	Asociación positiva, significativa (OR=1,52) en varones; asociación negativa, no significativa en mujeres	Kampmann et al (1994b) ⁵⁴

delgado en ratas macho⁴⁶. La disminución porcentual de la incidencia tumoral fue del 80% en el hígado y del 100% en el colon. En ratas hembra, los suplementos dietéticos con cultivos de *Bifidobacterium* también disminuyeron la carcinogénesis mamaria inducida por IQ hasta un 50% y la carcinogénesis hepática hasta un 27%, en comparación con la dieta de control, pero las diferencias no fueron significativas. Sin embargo, se identificaron cambios significativos en la multiplicidad tumoral en la glándula mamaria.

Recientemente, se ha desarrollado un modelo de ratón (ratones *Min*) en el que los animales son heterocigotos para una mutación por inversión «anti-sense» del gen *Apc*, el homólogo murino de APC. Estos ratones, que desarrollan adenomas espontáneos en todo el intestino delgado y el colon al cabo de pocas semanas, se han utilizado para examinar los agentes quimioprotectores dirigidos frente a lesiones cancerosas. En uno de estos estudios se alimentó a ratones *Min* con diversas dietas que contenían salvado de trigo, almidón resistente o FOS (5,8% en la dieta) durante 6 semanas. El número de tumores no se modificó a partir del control (dieta sin fibra) en ratones alimentados con salvado de trigo o almidón resistente, pero se observó una disminución significativa de los tu-

mores de colon en ratas tratadas con la dieta suplementada con FOS. Además, cuatro de los 10 animales alimentados con FOS se encontraron libres de tumores de colon⁴⁷. Goldin et al⁴⁸ investigaron el efecto de *Lactobacillus* GG en ratas tratadas con DMH antes, durante y después de la exposición a este carcinógeno (protocolo de iniciación más promoción) o después (protocolo de promoción) del tratamiento con el carcinógeno. Utilizando el primer protocolo se observó una disminución significativa de la incidencia de tumores de colon (71 frente al 100% en ratas de control), y el número de tumores por animal portador de un tumor (1,7 comparado con 3,7 en animales de control). Sin embargo, cuando se administró *Lactobacillus* GG después de DMH, no se identificó una disminución de la incidencia tumoral, lo que indica que el efecto de las BAL se produjo sobre el estadio de iniciación más que sobre el estadio de promoción de la tumorigénesis. En este estudio, las ratas fueron alimentadas con dietas basales con un contenido elevado o bajo de grasa. Aunque la disminución de la incidencia de tumores de colon inducida por probióticos fue similar con ambas dietas, los efectos sobre la multiplicidad tumoral fueron más pronunciados en los animales alimentados con una dieta rica en grasas.

TABLA VII. Efecto de los probióticos y prebióticos sobre el cáncer/biomarcadores de cáncer en estudios intervencionistas en seres humanos

Individuos	Criterio de valoración	Probiótico/prebiótico	Resultado	Autor
18 varones y mujeres sanos	Citotoxicidad agua fecal en células HT29 y genotoxicidad (análisis Cometa)	Productos lácteos comparado con una dieta de bajo consumo de lácteos	Disminución citotoxicidad del agua fecal durante el consumo elevado de lácteos. Ausencia de efecto sobre genotoxicidad	Glinghammar et al (1997) ⁵⁵
6 individuos sanos	Mutagenicidad urinaria después del consumo de buey frito	<i>L. casei</i>	Disminución mutagenicidad urinaria (p < 0,001)	Hayatsu et al (1993) ⁵⁶
11 individuos sanos	Mutagenicidad urinaria y fecal después del consumo de buey frito	<i>L. acidophilus</i>	El consumo de probióticos disminuyó la excreción urinaria de mutágenos en un 50-70% y la excreción fecal de mutágenos en un 30%	Lidbeck et al (1992) ⁵⁷
20 pacientes con adenomas de colon	Hiperproliferación epitelial en biopsias de mucosa rectal	<i>L. acidophilus</i> y <i>B. bifidum</i>	La administración de BAL redujo la proliferación rectal sólo en pacientes con tasas elevadas de proliferación basal	Biasco et al (1991) ⁵⁸

BAL: bacterias productoras de ácido láctico.

PROBIÓTICOS Y CÁNCER EN LOS ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS EN SERES HUMANOS (tabla VI)⁴⁹⁻⁵⁴

En Holanda, un estudio de caso-controles puso de manifiesto que algunos productos lácteos fermentados confieren un efecto protector frente al cáncer de mama. Los resultados del consumo de > 225 g/día de productos lácteos fermentados (yogur, suero de leche, cuajada y kefir) redujo la *odds ratio* hasta 0,50⁴⁹.

Los resultados de un estudio de casos-controles llevado a cabo por Boutron et al⁵⁰ indicaron una relación inversa significativa (p = 0,03) entre el riesgo de grandes adenomas colónicos tanto en varones como en mujeres y el consumo de cantidades moderadas (0,5-1 envase al día) de yogur. Las *odds ratio* fueron de 0,6 y 0,5, respectivamente, para ambos niveles de consumo de yogur. No se identificó una relación entre el riesgo de cáncer colorrectal y el consumo de yogur. Otros estudios poblacionales de casos-controles han proporcionado pruebas de asociaciones inversas del riesgo de cáncer colorrectal y el consumo de productos a base de leche fermentada⁵¹ y yogur^{52,53}, documentaron una relación inversa no significativa entre el consumo de yogur y los adenomas de colon. No obstante, este hallazgo no se confirmó en un estudio ulterior de casos-controles en Holanda sobre riesgo de cáncer colorrectal y productos lácteos fermentados, que reveló una pequeña asociación positiva significativa en varones (OR = 1,52) y una pequeña asociación inversa no significativa en mujeres (OR = 0,77)⁵⁴.

PROBIÓTICOS Y CÁNCER EN ESTUDIOS DE INTERVENCIÓN EN SERES HUMANOS (tabla VII)⁵⁵⁻⁵⁸

Los estudios de intervención con el objetivo de evaluar la capacidad de los probióticos para prevenir el cáncer en el ser humano se han basado en su mayor parte en la utilización de biomarcadores para evaluar el riesgo de cáncer. Debido a su naturaleza no invasiva, se han utilizado principalmente marcadores en heces y en orina. Por ejemplo, se considera que la fase acuosa de las heces humanas (agua fecal) es una importante fuente de inductores y moduladores de la carcinogénesis en el colon y están disponibles métodos para evaluar las actividades

biológicas relacionadas con el riesgo de cáncer en estas muestras.

Con el objetivo de determinar si un cambio en el consumo de productos lácteos afecta a la citotoxicidad y genotoxicidad del agua fecal, en 18 varones y mujeres sanos se modificó su consumo normal de productos lácteos por una dieta sin lácteos en un estudio de diseño cruzado⁵⁵. La citotoxicidad del agua fecal, analizada mediante el análisis de citotoxicidad HT29, indicó una disminución de la supervivencia celular del 34 al 20% cuando los productos lácteos fueron excluidos de la dieta de los individuos. Se considera que este análisis refleja la potencial actividad promotora tumoral y sugiere que los productos lácteos conferirían efectos beneficiosos. Para analizar la genotoxicidad del agua fecal se utilizó la prueba Cometa (electroforesis en gel de célula única), que no indicó diferencias debidas a la intervención dietética.

Hayatsu et al⁵⁶ examinaron el efecto de la administración oral de *L. casei* durante 3 semanas en 6 individuos sanos no fumadores sobre la mutagenicidad urinaria inducida por consumo de carne picada de buey frito utilizando la prueba de Ames (*Salmonella typhimurium* TA98, con una mezcla de S9). Se dividió a los 6 individuos en dos grupos, un grupo al que se administró *L. casei* 3×10^{10} células/día y otro grupo al que se administraron suplementos de *L. casei* $1,5 \times 10^{11}$ células/día durante 3 semanas. Se obtuvo orina antes del consumo de carne y se recogió orina a las 0-12 y 12-24 h después de la comida a base de carne. Se observó un efecto supresor de la administración de *L. casei* (6-67% de la mutagenicidad detectada en el grupo de control) cuando se comparó la mutagenicidad en la orina de control con los resultados de la orina obtenida durante el período de administración de *L. casei*. La actividad media de las 2 muestras recogidas en los períodos de 12 h fue del 47,5% en relación con el control, y la disminución fue estadísticamente significativa.

Lidbeck et al⁵⁷ llevaron a cabo un estudio en 11 individuos que como parte de su dieta (0-2 días) consumieron hamburguesas fritas, que son una fuente de mutágenos de tipo pirolisato detectables en orina. Se administró leche con *Lactococcus* como control (10^{10} - 10^{11} /día) 2 días antes de los suplementos dietéticos de hamburguesas fritas hasta 6 días más tarde. El segundo grupo recibió el probiótico *Lactobacillus acidophilus* a una dosis de $1-5 \times 10^{11}$

células/día, empezando una vez más 2 días antes de la adición de la hamburguesa y hasta 6 días después. El consumo de BAL disminuyó la excreción urinaria de mutágenos en un 50-70% y la excreción de mutágenos fecales disminuyó en un 30%.

Se considera que el aumento de la proliferación celular en las criptas de la mucosa es un marcador de riesgo elevado de cáncer. En un estudio sobre el efecto de las BAL sobre la proliferación celular de la mucosa rectal, Biasco et al⁵⁸ administraron 6 cápsulas/día con 10^9 de *L. acidophilus* y 10^9 de *B. bifidum* durante un período de 3 meses a 20 pacientes con adenomas de colon. Se obtuvieron 4 biopsias rectales en el período basal y después del tratamiento y se evaluó la proliferación celular en la parte superior de las criptas de la mucosa rectal mediante incorporación de timidina tritiada. En conjunto, no se identificaron diferencias significativas en la proliferación de células de las criptas antes y después del tratamiento. Sin embargo, en 8 pacientes con elevadas tasas de proliferación celular se identificó una disminución significativa de la proliferación después de BAL ($0,21 \pm 0,03$ comparado con $0,10 \pm 0,03$; $p < 0,03$).

Aso et al⁵⁹ investigaron la administración de *L. casei* (Biolactis en polvo, 3 g/día) en la recidiva de un carcinoma superficial de células transicionales de la vejiga después de una resección transuretral en 125 pacientes. En pacientes con tumores múltiples primarios o tumores recurrentes únicos, la proporción de pacientes sin recidiva aumentó del 54,9% en el grupo placebo hasta el 79,2% en el grupo tratado con *L. casei*. Sin embargo, no se identificó un efecto significativo en pacientes con tumores múltiples recurrentes que tenían muy mal pronóstico. Los autores sugieren que la estimulación del sistema inmunitario por parte de los lactobacilos constituiría un importante factor en su efecto sobre los pacientes.

MECANISMOS DE LA ANTICARCINOGENICIDAD Y ANTIGENOTOXICIDAD

Unión a los carcinógenos

Se ha publicado un elevado número de artículos que describen que las BAL y otras bacterias intestinales adsorben o se unen *in vitro* a diversos carcinógenos de origen alimentario, incluyendo las aminas heterocíclicas formadas durante la cocción de la carne, la toxina fúngica aflatoxina B1, benzo(a)pireno y el contaminante alimentario AF2^{30,32,34,37,60}. En varios de estos estudios se ha descrito una disminución concomitante de la mutagenicidad. El grado de unión dependió del mutágeno y de la cepa bacteriana utilizados, observándose en general una mayor unión con las aminas heterocíclicas y una menor unión con aflatoxina B1 y AF2. La absorción parece ser un fenómeno físico, principalmente debido a un intercambio de cationes.

Sin embargo, aunque la unión representa un mecanismo verosímil para la inhibición de la genotoxicidad y mutagenicidad por las BAL *in vitro*, no parece tener influencias *in vivo*. Bolognani et al³⁴ demostraron que la admi-

nistración simultánea de BAL con diversos carcinógenos a ratones careció de efecto sobre la absorción de las sustancias a partir del tracto gastrointestinal, y no afectó a la mutagenicidad *in vivo* de los carcinógenos en el hígado. Es preciso mencionar que estos resultados contrastan con los de Zhang y Ohta⁶¹, que pusieron de relieve que la absorción de Trp-P-1 a partir del intestino delgado de rata disminuyó significativamente mediante la coadministración de BAL congeladas-secadas. Sin embargo, este último estudio fue confuso por la utilización de ratas sometidas a ayuno durante 4 días, lo que induciría un importante estrés nutricional y fisiológico en los animales.

EFFECTOS SOBRE LAS ENZIMAS BACTERIANAS Y LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS

Los estudios citados en las tablas I y II demuestran que el aumento de la concentración de BAL como consecuencia del consumo de BAL y/o prebióticos da lugar a una disminución de algunas enzimas bacterianas que se considera que participan en la síntesis o activación de carcinógenos, genotoxinas y promotores tumorales. Esto parece deberse a la reducida actividad específica de estas enzimas en las BAL¹⁵. Se ha sugerido que estos cambios de la actividad enzimática o la concentración de metabolitos serían responsables de la disminución del nivel de las lesiones preneoplásicas o tumores observada en ratas tratadas con carcinógenos a las que se administran probióticos y prebióticos^{20,46}. Aunque no se ha demostrado una relación causal, sigue siendo una hipótesis verosímil.

ESTIMULACIÓN DE ENZIMAS PROTECTORAS

Muchos de los carcinógenos alimentarios, como las aminas heterocíclicas y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, son conjugados en glutatión, que parece dar lugar a una inactivación. La enzima implicada, la glutatión transferasa (GSH), se identifica en el hígado y otros tejidos incluyendo el intestino delgado. En un estudio sobre el efecto de *B. longum* y lactulosa sobre los FCA inducidos por AOM en el colon, Challa et al³⁹ pusieron de manifiesto que la actividad de la GSH en la mucosa colónica se relacionó inversamente con el número de FCA. Este mecanismo de protección sería eficaz frente a una amplia serie de carcinógenos dietéticos.

AUMENTO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA

Otro mecanismo sugerido por Perdigon et al⁶² mediante el que los probióticos ejercen una actividad antitumoral es la reducción de la respuesta inmunoinflamatoria. En un estudio sobre crecimiento tumoral en ratones tratados con DMH se puso de manifiesto que el yogur suprime la respuesta inmunitaria inflamatoria, con un aumento de las células secretoras de IgA y de los linfocitos T CD4+. En estos animales se identificó una disminución destacada de los tumores. También se ha propuesto un mecanismo inmunitario para explicar la prolongación del tiempo antes

de la recidiva tumoral en pacientes con cáncer de vejiga tratados con *L. casei*⁵⁹, aunque los autores no presentaron pruebas que apoyaran el mecanismo.

Estos estudios son consistentes con los de Schiffrin et al⁶³ y Marteau et al⁶⁴, que han proporcionado pruebas de una modulación del sistema inmunitario en seres humanos que consumen probióticos. Los cambios observados fueron un aumento de la actividad fagocítica de monocitos y granulocitos y aumentos de los valores de células secretoras de anticuerpos. No se ha establecido el significado de estos cambios en relación con el desarrollo tumoral.

CONCLUSIONES

En conjunto, los estudios en sistemas *in vitro* y en una amplia variedad de modelos animales proporcionan pruebas considerables de que los probióticos y, en menor grado los prebióticos, tienen potencial para reducir el riesgo de cáncer de colon. Las pruebas en estudios con seres humanos son menos concluyentes, pero sugieren que los alimentos con fermentos lácticos tiene un efecto preventivo del cáncer de colon. Claramente se requieren más estudios intervencionistas cuidadosamente controlados en seres humanos utilizando biomarcadores del riesgo de cáncer. Los datos de los estudios en animales sugieren que la utilización de una combinación de probióticos y prebióticos es la estrategia más eficaz para maximizar cualquier efecto anticarcinogénico.

AGRADECIMIENTO

Anthony J. Burns desea expresar su agradecimiento por la financiación de St Ivel Ltd.

BIBLIOGRAFÍA

- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365-78.
- Salminen S, Bouley C, Bouton-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998;80 (suppl 1):S147-71.
- Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991;32:439-42.
- Sanders ME. Effect of consumption of Lactic cultures on human health. *Adv Food Nutr Res* 1993;37:67-130.
- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:1401-12.
- Silvi S, Rumney CJ, Cresci A, Rowland IR. Resistant starch modifies gut microflora and microbial metabolism in human flora-associated rats inoculated with faeces from Italian and UK donors. *J Appl Microbiol* 1999;86:521-30.
- Rowland IR, Tanaka R. The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. *J Appl Bact* 1993;74:667-74.
- Rowland IR. Toxicology of the colon - role of the intestinal microflora. En: Macfarlane GT, Gibson G, editors. *Human colonic bacteria, role in nutrition, physiology and pathology*. Boca Raton: CRC Press, 1995; p. 155-74.
- Rowland IR, Gangolli SD. Role of gastrointestinal flora in the metabolic and toxicological activities of xenobiotics. En: Ballantyne B, Marrs TC, Syverson T, editors *General and applied toxicology*. 2nd ed. London: Macmillan Publishers Ltd., 1999; p. 561-76.
- Venturi M, Hambly RJ, Glinghammar B, Rafter JJ, Rowland IR. Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile acids: a study using the alkaline comet assay. *Carcinogenesis* 1997;18:2353-9.
- Reddy BS, Narisawa T, Wright P, Vukusich D, Weisburger JH, Wynder EL. Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germ-free rats. *Cancer Research* 1975;35: 287-90.
- Rumney CJ, Rowland IR, Coutts TM, Randerath K, Reddy R, et al. Effects of risk-associated human dietary macrocomponents on processes related to carcinogenesis in human-flora-associated (HFA) rats. *Carcinogenesis* 1993;14:79-84.
- Massey RC, Key PE, Mallett AK, Rowland IR. An investigation of the endogenous formation of apparent total N-nitroso compounds in conventional microflora and germ-free rats. *Food Chem Toxicol* 1998;26:595-600.
- Carman RJ, Vantassell RL, Kingston DGI, Bashir M, Wilkins TD. Conversion of IQ, a dietary pyrolysis carcinogen to a direct acting mutagen by normal intestinal bacteria of humans. *Mutat Res* 1998;206:335-42.
- Saito Y, Takano T, Rowland IR. Effects of soybean oligosaccharides on the human gut microflora in *in vitro* culture. *Microb Ecol Health Dis* 1992;5:105-10.
- Goldin BR, Gorbach SL. The relationship between diet and rat faecal bacterial enzymes implicated in colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 1976;57:371-5.
- Cole CB, Fuller R, Carter SM. 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 Health Dis* 1989;2:223-5.
- Goldin BR, Gorbach SL. Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics, and *Lactobacillus*: decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes, and glucuronides. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:689-95.
- Tokunga T, Oku T, Hoysoya N. Influence of chronic intake of new sweetener fructooligosaccharide (Neosugar) on growth and gastrointestinal function of the rat. *J Nutr Sci Vitaminol* 1986; 32:111-21.
- Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 1989;19:281-5.
- Hidaka H, Eida T, Takizawa T, Tokunga T, Tashiro Y. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora* 1986;5:37-50.
- Goldin BR, Gorbach SL. The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am J Clin Nutr* 1984;39:756-61.
- Lidbeck A, Geltner Allinger U, Orrhage KM, Ottova L, Brismar B, Gustafsson JA, et al. Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the faecal microflora and soluble faecal bile acids in colon cancer patients. *Microbial Ecol Health Dis* 1991;4:81-8.
- 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;52:899-907.
- Marteau P, Pochart P, Flourie B, Pellier P, Santos L, Desjeux J-F, et al. 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;52:685-8.
- Ayebo AD, Angelo IA, Shahani KM. Effect of ingesting *Lactobacillus acidophilus* milk upon faecal flora and enzyme activity in humans. *Milchwissenschaft* 1980;35:730-3.
- Bertazzoni-Minelli E, Benini A, Vicentini L, Andreoli E, Oselladore M, Cerutti R. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* administration on colonic microbiota and its metabolic activity in premenstrual syndrome. *Microb Ecol Health Dis* 1996;9:247-60.
- Tanaka R, Takayama H, Morotomi M, Kuroshima T, Ueyama S, Matsumoto K, et al. Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human faecal flora. *Bifidobacteria Microflora* 1983;2:17-24.
- Hayakawa K, Mizutani J, Wada K, Masai T, Yoshihara I, Mituoka T. Effects of soybean oligosaccharides on human faecal microflora. *Microb Ecol Health Dis* 1990;3:293-303.

30. Zhang XB, Ohta Y, Hosono A. Antimutagenicity and binding of lactic acid bacteria from a Chinese cheese to mutagenic pyrolyzates. *J Dairy Sci* 1990;73:2702-10.
31. Pool-Zobel BL, Munzner R, Holzaapfel H. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the *S. typhimurium* Mutagenicity assay. *Nutr Cancer* 1993;20:261-70.
32. Morotomi M, Mutai M. *In vitro* binding of potent mutagenic pyrolyzates to intestinal bacteria. *J Natl Cancer Inst* 1986;77:195-201.
33. Ebringer L, Ferencik M, Lahitova N, Kacani L, Michalkova D. Anti-mutagenic and immuno-stimulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 1995;11:294-8.
34. 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;35:535-45.
35. Pool-Zobel BL, Neudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rumney C, et al. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr Cancer* 1996;26:365-80.
36. Rowland IR, Bearne CA, Fischer R, Pool-Zobel BL. The effect of lactulose on DNA damage induced by DMH in the colon of human flora associated rats. *Nutr Cancer* 1996;26:37-47.
37. Zhang XB, Ohta Y. *In vitro* binding of mutagenic pyrolyzates to lactic acid bacterial cells in human gastric juice. *J Dairy Sci* 1991;74:752-7.
38. 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.
39. 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.
40. Abdelali H, Cassand P, Soussotte V, Daubeze M, Bouley C, Narbonne JF. Effect of dairy products on initiation of precursor lesions of colon cancer in rats. *Nutr Cancer* 1995;24:121-32.
41. Gallaher DD, Stallings WH, Blessing LL, Busta FF, Brady LJ. Probiotics cecal microflora, and aberrant crypts in the rat colon. *J Nutr* 1996;126:1362-71.
42. Rao CV, Chou D, Simi B, Ku H, Reddy BS. Prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inulin and pectin. *Carcinogenesis* 1998;19:1815-9.
43. Reddy BS, Hamid R, Rao CV. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis* 1997;18:1371-4.
44. Pretlow TP, O'Riordan MA, Somitch GA, Amini SB, Pretlow TG. Aberrant crypts correlate with tumour incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate. *Carcinogenesis* 1992;13:1509-12.
45. Goldin BR, Gorbach SL. Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dichloride-induced intestinal cancer in rats. *J Natl Cancer Inst* 1980;64:263-5.
46. Reddy BS, Rivenson A. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Research* 1993;53:3914-8.
47. Pierre F, Perrin P, Champ M, Bornet F, Meflah K, Menanteau J. Short-chain fructo-oligosaccharides reduce the occurrence of colon tumours and develop gut associated lymphoid tissue in Min mice. *Cancer Research* 1997;57:225-8.
48. Goldin BR, Gualtieri LJ, Moore RP. The effect of *Lactobacillus GG* on the initiation and promotion of DMH - induced intestinal tumours in the rat. *Nutr Cancer* 1996;25:197-204.
49. Van't Veer P, Dekker JM, Lamers JWJ, Kok FJ, Schouten EG, Brants HAM, et al. Consumption of fermented milk products and breast cancer: a case-control study in the Netherlands. *Cancer Research* 1989;49:4020-3.
50. Boutron MC, Faivre J, Marteau P, Couillaud C, Senesse P, Qui-pourt V. Calcium, phosphorous, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis: a French case-control study. *Br J Cancer* 1996;74:145-51.
51. Young TB, Wolf DA. Case-control study of proximal and distal colon cancer and diet in Wisconsin. *Int J Cancer* 1988;42:167-75.
52. Peters RK, Pike MC, Garabrant D, Mack TM. Diet and colon cancer in Los Angeles County, California. *Cancer Causes Control* 1992;3:457-73.
53. Kampmann E, Giovanucci van't Veer P, Rimm E, Stampfer MJ, Colditz GA, Kok FJ, et al. Calcium, vitamin D, dairy foods, and the occurrence of colorectal adenomas among men and women in two prospective studies. *Am J Epidemiol* 1994;139:16-29.
54. Kampman E, van't Veer P, Hiddink GJ, Van Aken-Schneijder P, Kok FJ, Hermus RJ. Fermented dairy products, dietary calcium and colon cancer: a case-control study in the Netherlands. *Int J Cancer* 1994;59:170-6.
55. Glinghammar B, Venturi M, Rowland IR, Rafter JJ. Shift from a dairy product-rich to a dairy product-free diet: influence on cytotoxicity and genotoxicity of fecal water-potential risk factors for colon cancer. *Am J Clin Nutr* 1997;66:1277-82.
56. 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 Lett* 1993;73:173-9.
57. Lidbeck A, Nord CE, Gustafsson JA, Rafter J. *Lactobacilli*, anticarcinogenic activities and human intestinal microflora. *Eur J Cancer Prevention* 1992;1:341-53.
58. Biasco G, Paganelli GM, Brandi G, Brillanti S, Lami F, Callegari C, et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on rectal cell kinetics. *Ital J Gastroenterol* 1991;23:142.
59. Aso Y, Akaza H, Kotake T, Tsukamoto T, Imai K, Naito S. Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double - blind trial. The BLP study group. *Eur Urol* 1995;27:104-9.
60. Orrhage K, Sillerstrom E, Gustafsson J-Å, Nord CE, Rafter J. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat Res* 1994;311:239-48.
61. Zhang XB, Ohta Y. Microorganisms in the gastrointestinal tract of the rat prevent absorption of the mutagen-carcinogen 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b)indole. *Can J Microbiol* 1993;39:841-5.
62. Perdigon G, Valdez JC, Rachid M. Antitumour activity of yoghurt: study of possible immune mechanisms. *J Dairy Res* 1998;65:129-38.
63. Schiffrin E, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann J, Donnet-Hughes A. Immunomodulation of blood cells following ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 1996;78:491-7.
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. *Gastroenterol. Clin Biol* 1997;21:293-8.