



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma De México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Efecto de la exposición intragástrica de las
partículas E171 en colon de un modelo murino
de cáncer colorrectal**

**Tesis que para obtener el título de
Biólogo**

PRESENTA

Luis Guillermo Garduño Balderas

Directora de Tesis

Dra. Yolanda Irasema Chirino López



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de la Unidad de Biomedicina de la facultad de estudios superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CB2011/166727.

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación de Tecnología (PAPIIT) por la beca para el desarrollo del trabajo. No. de Folio 092114.

Se agradece además al programa de ayuda para titulación otorgada por la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Agradecimientos personales

Agradezco a mis padres por su apoyo en mi formación ya que sin ellos, mucho de esto hubiera sido sumamente difícil. Su cariño, tolerancia, fe y apoyo hacia mí, fueron y serán de gran importancia en mi persona. Gracias a su esfuerzo he podido lograr este trabajo.

"Sin una familia, el hombre, solo en el mundo, tiembla de frío."
André Maurois

Doy gracias a la Dra. Yolanda por brindarme la oportunidad de trabajar con ella, que gracias a sus exigencias, pláticas y paciencia me hizo crecer como persona y profesionalmente además de que me brindó armas para seguir creciendo aún más. Gracias a la confianza que depositó en mí he podido lograr esta meta, que en muchas ocasiones tenía más confianza en mí, que yo mismo.

"Un profesor trabaja para la eternidad: nadie puede decir dónde acaba su influencia."
Henry Brooks Adams

A mi mejor amiga, mi hermana de vida y experiencias, Karla, quien siempre me ha apoyado y me ha acompañado en todo momento, que con sus pláticas me aconseja y me hace ser mejor persona, siempre ha sido un privilegio y dicha tenerte a mi lado, te quiero mucho y gran parte de este pequeño éxito es gracias a ella.

"Los amigos: una familia cuyos individuos se eligen a voluntad."
Alphonse Karr

A mis amigos y compañeros del laboratorio Ingrid, Alex e Ismael, los cuales me enseñaron muchas cosas e hicieron que el laboratorio fuera más sobrecogedor.

"Sin la amistad, el mundo es un desierto."
Sir Francis Bacon

Abreviaturas

-AOM	Azoximetano
-Gen APC	del inglés Adenomatous polyposis coli
-CA	Cripta aberrante
-CU	Colitis ulcerativa
-CCR	Cáncer colorrectal
-Gen CTNNB1	del inglés Catenin (cadherin-associated protein) β 1
-DSS	Dextrán sulfato de sodio
-EII	Enfermedades inflamatorias del intestino
-FDA	del inglés Food and Drug Administration
-HNPPC	del inglés Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
-IARC	del inglés International Agency for Research on Cancer
-IGF-1	del inglés Insulin-like growth factor 1
-KIM-1	del inglés Kidney injury molecule 1
-Gen MSH1	del inglés Mismatch repair protein 1
-Gen MSH2	del inglés Mismatch repair protein 2
-Gen MSH6	del inglés Mismatch repair protein 6
-Gen MLH1	del inglés MutL homolog 1
-Gen MUTYH	del inglés MutY homolog
-NIOSH	del inglés National Institute for Occupational Safety and Health
-NPs de TiO ₂	Nanopartículas de Dióxido de Titanio
-PJ	del inglés Peutz-Jeghers
-Gen PMS2	del inglés Postmeiotic segregation increased 2
-SC	Síndrome de Crohn
-Gen STK1	del inglés Serine/threonine protein kinase Stk1
-TiO ₂	Dióxido de titanio

Índice general

1. Introducción	1
1.1 Cáncer colorrectal	1
1.2 Factores de riesgo para el desarrollo de CCR: predisposición genética	3
1.3 Factores de riesgo para el desarrollo de CCR: estilo de vida	5
1.4 Histopatología del CCR	7
1.5 El uso del TiO ₂ en los alimentos: aditivo E171	9
1.6 Regulación en México sobre el consumo de E171 en alimentos	10
1.7 Efecto de la exposición a TiO ₂ /E171 en modelos experimentales	12
1.8 Modelo murino de CCR con azoximetano y dextrán sulfato de sodio	13
2. Justificación	15
3. Hipótesis	16
4. Objetivos General	17
4.1 Objetivos Particulares	17
5. Material y métodos	18
5.1 Inducción de cáncer colorrectal	18
5.2 Tinción de hematoxilina y eosina	19
5.3 Cuantificación histológica de células caliciformes	21
5.4 Medición de citocinas en suero	22
5.5 Medición de citocinas en colon mediante lector Bio-Plex multiplex MAGPIX	23
5.6 Análisis estadístico	24
6. Resultados	24
6.1 Consumo de agua y alimento	24
6.2 Peso de ratones	25
6.3 Daños estructurales en órganos a 42 y 72 días	27
6.4 Peso y longitud del colon	30
6.5 Citocinas en suero y colon	31
6.6 Número de tumores en colon	33
6.7 Daños histológicos en el epitelio del colon	37
6.8 Disminución de células caliciformes en el colon	40

7. Discusión	42
8. Conclusiones	45
9. Referencias	47

Índice de figuras

1. Incidencia a nivel mundial de tipos de cáncer	2
2. Incidencia de cáncer de acuerdo al desarrollo económico	2
3. Porcentaje de incidencia de tipos de CCR esporádicos	3
4 Intestino grueso	8
5. Cripta de Lieberkühn	9
6. Estructuras cristalinas de TiO ₂	10
7. Ruta de azoximetano	14
8. Modelo de AOM/DSS	18
9. Gráfica de consumo de alimento	24
10. Gráfica de consumo de agua	25
11. Gráfica de peso de ratones	26
12. Peso de hígado	27
13. Análisis histológico de hígado	28
14. Análisis histológico de riñón	28
15. Peso de riñones	29
16. Concentración de creatinina y urea	29
17. Peso de bazo	30
18. Peso de colon	31
19. Concentración de IL-10 en suero	31
20. Concentración de citocinas en suero	32
21. Concentración de citocinas en colon	33
22. Parte media del colon	34
23. Parte distal del colon	35
24. Representación de colon completo diseccionado	36
25. Número de tumores en la parte distal del colon	37
26. Cortes histológicos de colon 10x	38
27. Cortes histológicos de colon 20x	39
28. Número de células caliciformes	40
29. Identificación de células caliciformes	41

Índice de tablas

1. Genes mutados asociados al desarrollo de CCR	5
2. Cantidad permitida de E171 en los alimentos por la FDA y la Norma Oficial Mexicana	11

Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) ocupa el 2° y 3^{er} lugar en incidencia a nivel mundial para mujeres y hombres respectivamente. Este padecimiento se puede desarrollar por predisposición genética y/o el estilo de vida. La predisposición genética normalmente produce los síndromes de poliposis adenomatosa familiar (FAP) y el cáncer colorrectal hereditario sin pólipos (HNPCC), entre otros síndromes que están relacionados a CCR. El estilo de vida engloba varios factores de riesgo, a los cuales se les confiere del 70% al 90% de los casos. En estos factores se encuentran las enfermedades inflamatorias del intestino como colitis ulcerativa y síndrome de Crohn, así como la hiperinsulinemia, el sedentarismo, el consumo de alcohol, el tabaquismo y la dieta. La mayoría de estos factores afectan directamente al epitelio del colon, el cual está constituido por invaginaciones llamadas criptas de Lieberkühn. En el colon se almacenan las heces, se lleva a cabo la concentración fecal y se absorben agua y electrolitos. El primer cambio carcinogénico que ocurre en el colon es la transformación de las criptas de Lieberkühn a criptas aberrantes. Éstas se caracterizan por el incremento de tamaño, el aumento de la zona pericriptica y por la presencia de un grueso revestimiento epitelial. Una característica más de estas criptas es la pérdida de células caliciformes y su decremento en mucina. Los procesos inflamatorios crónicos participan en los procesos carcinogénicos. Por estudios realizados *in vivo* se ha observado que las nanopartículas de TiO₂ desarrollan procesos inflamatorios al ser administradas intragástricamente. Adicionalmente estas nanopartículas en exposición inhalatoria están clasificadas como posibles carcinógenas por la IARC (International Agency for Research on Cancer). Algunos alimentos contienen nanopartículas de TiO₂, en forma del aditivo E171. Este aditivo se agrega a los alimentos para mejorar sus propiedades organolépticas. El E171 está compuesto de un 36% de nanopartículas de TiO₂ y el resto de micropartículas del mismo material. Su uso está permitido por la FDA (Food and Drug Administration) y las normas mexicanas. El propósito de este estudio fue observar si la exposición subcrónica vía intragástrica exacerba el número de tumores en un modelo murino de cáncer colorrectal. Esto se realizó induciendo cáncer colorrectal a ratones BALB/c mediante el modelo de azoximetano (12.5 mg/kg) y dextrán sulfato de sodio (2% en

agua). Se dio una dosis de 5 mg/kg de E171 vía intragástrica a los ratones durante 7 (42 días) y 10 (72 días) semanas, 5 días por semana (lunes a viernes). Separándolos en grupos: 1) Control 42 y 72 días, 2) CCR 42 y 72 días, 3) E171 42 y 72 días y 4) CCR+E171 42 y 72 días. Al terminar dicho esquema se sacrificaron y se extrajo el colon, hígado, bazo y riñones, así como suero para medir citocinas. En tinción de hematoxilina y eosina de colon se observó una exacerbación del número de tumores en el grupo CCR+E171 en comparación al grupo CCR. El grupo E171 no tuvo tumores, pero tenía criptas aberrantes, que son lesiones pre carcinogénicas. Con la tinción de azul alciano y rojo nuclear sólido, para teñir células caliciformes se observó un descenso en el número de dichas células; además de pérdida de peso en el riñón pero sin pérdida funcional de acuerdo a los marcadores de daño evaluados. En el grupo tratado con E171 a 72 días en hígado se observan a las células de Kupffer con hiperplasia. Se pudo ver en este trabajo que la administración subcrónica de E171 en un modelo murino de cáncer colorrectal aumenta el número de tumores, teniendo 4 veces más tumores en el grupo CCR+E171 que en el grupo CCR. Por lo tanto la exposición subcrónica a E171 vía intragástrica exagera el número de tumores un modelo murino de cáncer colorrectal.

Palabras clave:

Nanopartículas de TiO₂, cáncer colorrectal, aditivo E171, exposición oral, células caliciformes, criptas aberrantes.

1. Introducción

1.1 Cáncer colorrectal

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento no controlado de las células, las cuales han perdido su función y estructura original correspondiente al tejido al que pertenecen, debido a una serie de alteraciones moleculares. Esto conlleva a la formación de una neoplasia. Los tumores malignos crecen rápidamente, se esparcen a tejidos adyacentes y pueden producir metástasis (Tanaka T. *et al.*, 2009).

Para el 2012 se reportaron 14.1 millones de nuevos casos de cáncer a nivel mundial con una mortalidad del 58.2%. En regiones desarrolladas 6.1 millones fue el número de casos reportados mientras, que en regiones menos desarrolladas fue de 8.1 millones. A nivel mundial el cáncer colorrectal (CCR) ocupa el 3^{er} lugar en incidencia en hombres y el 2° en mujeres (Fig. 1) (GLOBOCAN., 2012). En zonas desarrolladas económicamente el CCR ocupa el 3^{er} lugar en incidencia para hombres y el 2° para mujeres, mientras que por causa de muerte ocupa el 2° y el 3^{er} lugar respectivamente. En zonas en vías de desarrollo económico en hombres ocupa la 4^a posición en incidencia y la 5^a posición en mujeres. En el caso de mortalidad en hombres ocupa la 5^a causa de muerte y en mujeres es la 6^a (Fig. 2) (Jemal A. *et al.*, 2011; GLOBOCAN., 2012).

Las tasas actuales muestran que entre un 5% y 6% de los individuos de la población mundial desarrollaran CCR en de su vida (American Cancer Society., 2009). En los últimos 50 años se reporta un rápido incremento en la incidencia de CCR en países en vías de desarrollo económico mientras que en los países desarrollados económicamente la tasa se estabiliza e incluso en los Estados Unidos ha disminuido (Center M. *et al.*, 2009). Para esto se han propuesto varios factores de riesgo. Los factores de riesgo genéticos solo se les conceden del 5 al 10% de casos de CCR (American Cancer Society., 2013). Los factores ambientales son los responsables del 70% al 90% de los casos de CCR (Pericleous M. *et al.*, 2013). La influencia de los factores ambientales registrada es tan importante, que se ha observado que individuos

que originalmente vivían en zonas de baja incidencia de CCR al migrar a zonas de alta incidencia eventualmente adquieren los mismos riesgos que los individuos originarios de dicha zona (Morgan G. *et al.*, 2008).

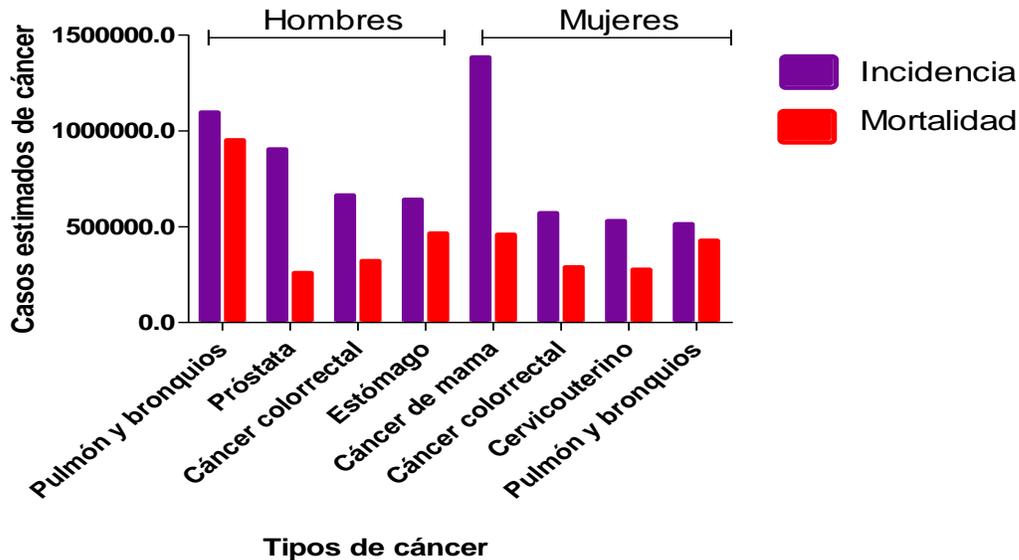


Figura 1. Incidencia a nivel mundial de tipos de cáncer. Tipos de cáncer y número de casos reportados en 2008 a nivel mundial (Jemal A., *et al.*, 2011 y GLOBOCAN., 2012).

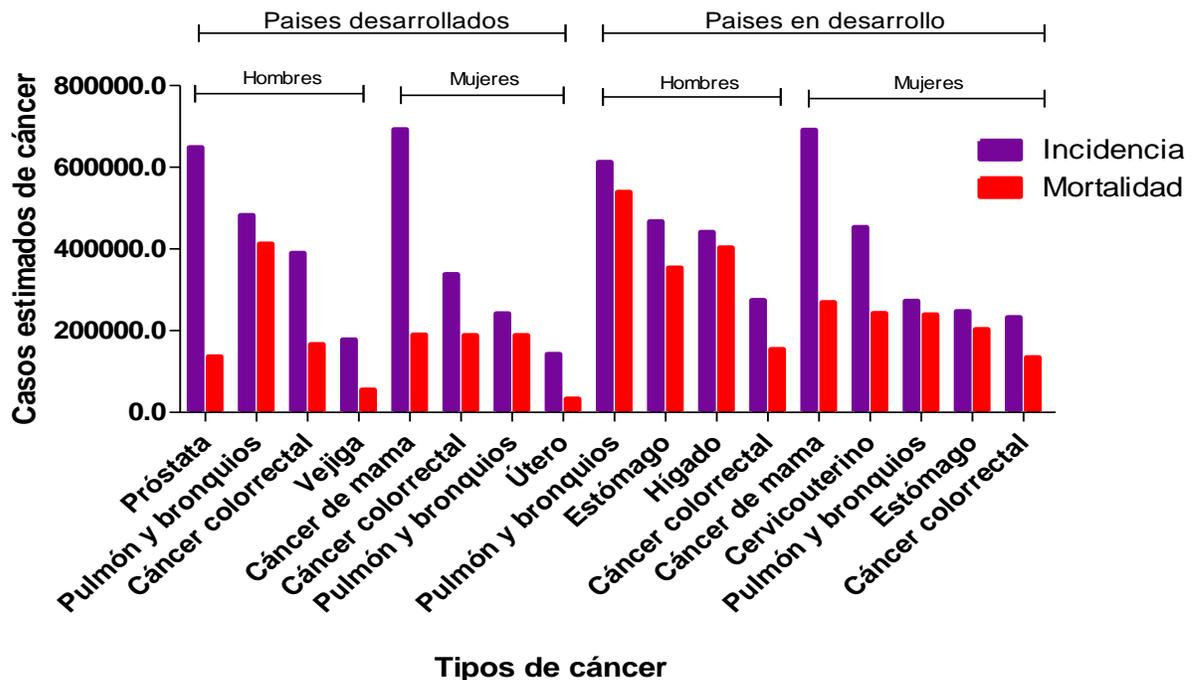


Figura 2. Incidencia de cáncer de acuerdo el desarrollo económico. Tipos de cáncer y número de casos reportados en 2008 según el tipo de desarrollo económico (Jemal A. *et al.*, 2011 y GLOBOCAN., 2012).

1.2 Factores de riesgo para el desarrollo de CCR: predisposición genética

Del 5% al 10% de los casos de CCR son debidos a que han heredado mutaciones. El CCR que deriva de estas mutaciones aparece en edades más tempranas que el que se desarrolla por factores ambientales. Hay varios tipos de síndromes ligados a CCR pero los dos más comunes son el de poliposis adenomatosa familiar (FAP) y el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC) o síndrome de Lynch (Fig. 3.) (Vasen H. *et al.*, 2004; American Cancer Society., 2013).

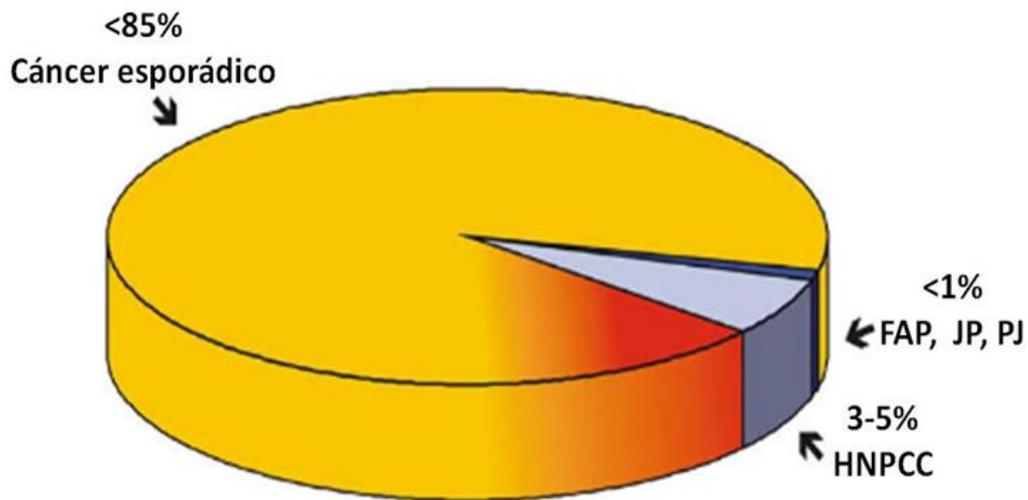


Figura 3. Porcentaje de incidencia de tipos de CCR esporádicos. FAP, poliposis adenomatosa familiar; HNPCC, síndrome de Lynch; JP, poliposis juvenil familiar; PJ, síndrome de Peutz-Jeghers. (Tomado y modificado de Half E. *et al.*, 2009).

FAP representa el 1% del total de todos los casos de CCR. Este síndrome es causado por mutaciones heredadas del gen APC (adenomatous polyposis coli). Las personas con FAP desarrollan cientos o miles de pólipos en el colon y recto a edades en promedio de los 15 a 20 años y a la edad de los 40 a 50 ya habrán desarrollado CCR (Half E. *et al.*, 2009; American Cancer Society., 2013).

Del 1% al 5% de todos los casos de CCR se deben a las mutaciones en genes como MSH1, MSH2, MSH6 (mismatch repair protein 1,2 y 6) y PMS2 (postmeiotic

segregation increased 2), que causan HNPCC o también llamado síndrome de Lynch. Los individuos con este síndrome tienen de un 60% a 85% de probabilidad de desarrollar CCR. Además de un 30% a 50% de posibilidad de desarrollar cáncer en el endometrio y menos del 15% de desarrollar otros tipos de cáncer (Vasen H. *et al.*, 2004).

Estos dos síndromes son los más importantes pero no los únicos (Tabla 1). Uno es el síndrome de Tucort, que es un desorden autosómico recesivo, que se caracteriza por la presencia del tumor primario en el sistema nervioso central y CCR, asociados a mutaciones en los genes MSH1, MSH2, MSH6 o PMS2 en los locus 3p22.2, 2p21, 2p16.3 y 7p 22.1 respectivamente. La diferencia con el síndrome de Lynch es que en el síndrome de Tucort aparecen tumores en el cerebro (American Cancer Society., 2013; Vallejo D. *et al.*, 2012).

El síndrome de Gardner es un síndrome hereditario autosómico dominante que se caracteriza por osteomas múltiples craneofaciales, tumores cutáneos y el crecimiento de pólipos intestinales, que son susceptibles a malignizar (Lahoz M. *et al.*, 2000; Singh K. *et al.*, 2014).

El síndrome de Peutz-Jeghers (PJ) es un síndrome hereditario autosómico dominante poco frecuente. Se caracteriza por la presencia de pólipos hematomatosos gastrointestinales y por la hiperpigmentación mucocutánea de los labios y mucosa bucal. La aparición de pólipos es más frecuente en el intestino delgado (64% de probabilidad), luego en el colon (53%), posteriormente en estómago (49%) y recto (32%). De 70% a 80% de los pacientes con PJ tienen mutaciones en el gen STK11 y arriba del 15% lo tienen deletado (American Cancer Society., 2013; Chae H. y Jeon C. 2014).

MUTYH es un gen que codifica para una glicosilasa de reparación de DNA por escisión de bases. Mutaciones en este gen causa MUTYH asociado a poliposis (MAP). Este es un síndrome autosómico recesivo, que se caracteriza por la presencia de pocos pólipos

adenomatosos colónicos e incremento del riesgo de CCR de acuerdo a la edad (American Cancer Society., 2013; Castillejo A. *et al.*, 2014).

Tabla 1. Genes mutados asociados al desarrollo de CCR

Genes mutados	Síndromes hereditarios que llevan al desarrollo de CCR (Factores Genéticos)	Características
APC	-Poliposis familiar adenomatosa (FAP)	Síndrome hereditario autosómico dominante.
APC y/o CTNNB1	-Síndrome de Gardner	Síndrome hereditario autosómico dominante.
MLH1, MSH1, MSH2, MSH6 y PMS2	-Cáncer de colon hereditario no asociado con pólipos (HNPCC) o síndrome de Lynch	Síndrome hereditario autosómico dominante.
MLH1, MSH2, PMS2 y APC	-Síndrome de Turcort	Síndrome hereditario autosómico recesivo.
STK1	-Síndrome Peutz-Jeghers	Síndrome hereditario autosómico dominante.
MUTYH	-Poliposis asociada con MUTYH	Síndrome hereditario autosómico recesivo.

(Ozerov S. *et al.*, 2013 y American Cancer Society., 2013)

1.3 Factores de riesgo para el desarrollo de CCR: estilo de vida

Los principales factores de riesgo ambientales que influyen en el desarrollo de CCR son el estilo de vida y las enfermedades inflamatorias del intestino (EII, conocidas en inglés como Inflammatory Bowel Diseases). Dentro de las EII se encuentran la colitis ulcerativa (CU) y el síndrome de Crohn (SC). La cantidad y la calidad de dieta, el consumo de alcohol, el tabaquismo y el sedentarismo están incluidos como componentes del estilo de vida importantes en el desarrollo de CCR (Morgan G. *et al.*, 2008; Pericleous M. *et al.*, 2013; Lakatos P. y Lakatos L., 2008).

El consumo de alcohol está relacionado con el desarrollo de CCR, se ha observado que quienes en promedio beben 2 copas al día tienen 2 veces más probabilidades de desarrollar CCR que los que beben 0.25 copas al día (Pericleous M. *et al.*, 2013). Esto

se debe al metabolismo del alcohol que da como resultado acetaldehído, que es un carcinogénico incluido en el grupo I de la clasificación de la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) (Durko L. y Malecka-Panas E. 2014; IARC., 2009). La relación entre el consumo de tabaco y el CCR se debe a que el cigarrillo libera hidrocarburos policíclicos aromáticos, aminas heterocíclicas y nitrosaminas que pueden alcanzar la mucosa del intestino por vía del torrente sanguíneo o por ingestión directa y estas forman alquildiazodios que es un alquilante de DNA (Chan A. y Giovannucci E., 2010).

La resistencia a insulina y la hiperinsulinemia relacionada a la obesidad es un factor de riesgo para el CCR, ya que los altos niveles de insulina provocan un aumento de IGF-1 (insulin-like growth factor 1). Los altos niveles IGF-1 inhiben la apoptosis y aumentan la proliferación celular (Giovannucci E., 2001). El sedentarismo como factor de riesgo de CCR está relacionado a la hiperinsulinemia ya que una persona que realiza actividad física, tiene bajos los niveles de insulina, además de que la actividad física aumenta la motilidad del colon que ayuda a la rápida expulsión de las heces. En algunos estudios se ha visto que personas que realizan una actividad física tienen de 20% a 30% menos probabilidad de padecer CCR, mientras que otros estudios demuestran que los casos de CCR aumentan en un 61% en hombres que informan un mayor sedentarismo en su estilo de vida, en otro estudio observan que hombres que pasaron ≥ 10 años en trabajos de sedentarismo requerido tienen dos veces más riesgo de desarrollar CCR (Sardo C. *et al.*, 2014; Chan A. y Giovannucci E., 2010; Boyle T. *et al.*, 2011).

Otro factor de riesgo que está involucrado con la hiperinsulinemia es la dieta. Este es de los factores que más influyen en la incidencia de CCR. Se estima que 20% de los casos diagnosticados de CCR se deben a este factor (Key T. *et al.*, 2004). El alto consumo de carne en la dieta, especialmente de carne roja y/o procesada favorece al desarrollo de CCR. Se estima que la tasa de riesgo aumenta en un 29% por cada 100 g/día de consumo de carne roja y un 21% por cada 50 g/día de carne procesada (Kim E. *et al.*, 2013). El mecanismo por el que la carne está asociado al riesgo de CCR es debido a que el consumo de ésta estimula la secreción endógena de insulina, además

que el alto contenido de hierro proveniente de ella promueve la proliferación de pólipos colorrectales, ya que este puede aumentar la tasa general de mutación y la promoción de mutaciones puntuales específicas en el DNA de tejido colónico. Se ha demostrado que el hierro del grupo hemo ayuda a catalizar la formación endógena de compuestos N-nitrosos, algunos de los cuales son agentes alquilantes directos del DNA (Gilsing A. *et al.*, 2013). Otros compuestos derivados de la cocción extrema de la carne como los compuestos N-nitroso y las aminas heterocíclicas son factores de riesgo para CCR. Las aminas heterocíclicas y los compuestos N-nitrosos forman alquildiazodio que es un agente alquilante que puede reaccionar con el DNA, RNA y proteínas (Chan A. y Giovannucci E. 2010; Kim E. *et al.*, 2013; Pericleous M. *et al.*, 2013; Hebels D., 2010).

Las enfermedades inflamatorias intestinales como CU y SC son un importante factor de riesgo para el CCR. El 5% de estos pacientes desarrollan tumores (Meira L. *et al.*, 2008). En el intestino grueso se ha descrito que el riesgo de desarrollar CCR aumenta según el grado de inflamación y los años que se lleve con la enfermedad. Pacientes que llevan 10 años con la enfermedad tienen 1.6% de riesgo de desarrollar CCR, los pacientes con 20 años tienen 8.3% y con 30 años 18.4% (Tanaka T. 2011). Se estima que de 25% a 40% de los pacientes con CU que no se realicen colectomías profilácticas desarrollarán CCR después de los 40 años (Clapper M. *et al.*, 2007).

1.4 Histopatología del CCR

Todos estos factores ambientales afectan al colon ya que éste se encarga de tres funciones importantes: la concentración fecal a través de la absorción del agua y electrolitos, almacenamiento y control de la evacuación de las heces y la digestión y absorción de los alimentos no digeridos (Thomson R. y Shaffer E., 2005). El intestino grueso es la parte final del tubo gástrico y está compuesto por el ciego con el apéndice vermiforme, el colon, el recto y el conducto anal. El colon por su parte está dividido en 4 regiones: colon ascendente, colon transversal, colon descendente y colon sigmoideo (Fig. 4) (Ross M. H. y Pawlina W., 2006). La mucosa del colon está compuesta por un gran número de invaginaciones llamadas criptas de Lieberkühn. Hay cuatro linajes

celulares que componen a la cripta, los enterocitos o llamados colonocitos, las células secretoras de mucina o células caliciformes, células endocrinas o enteroendocrinas y las células de Paneth (solo en la parte proximal) (Yen T-H. y Wright N., 2006).

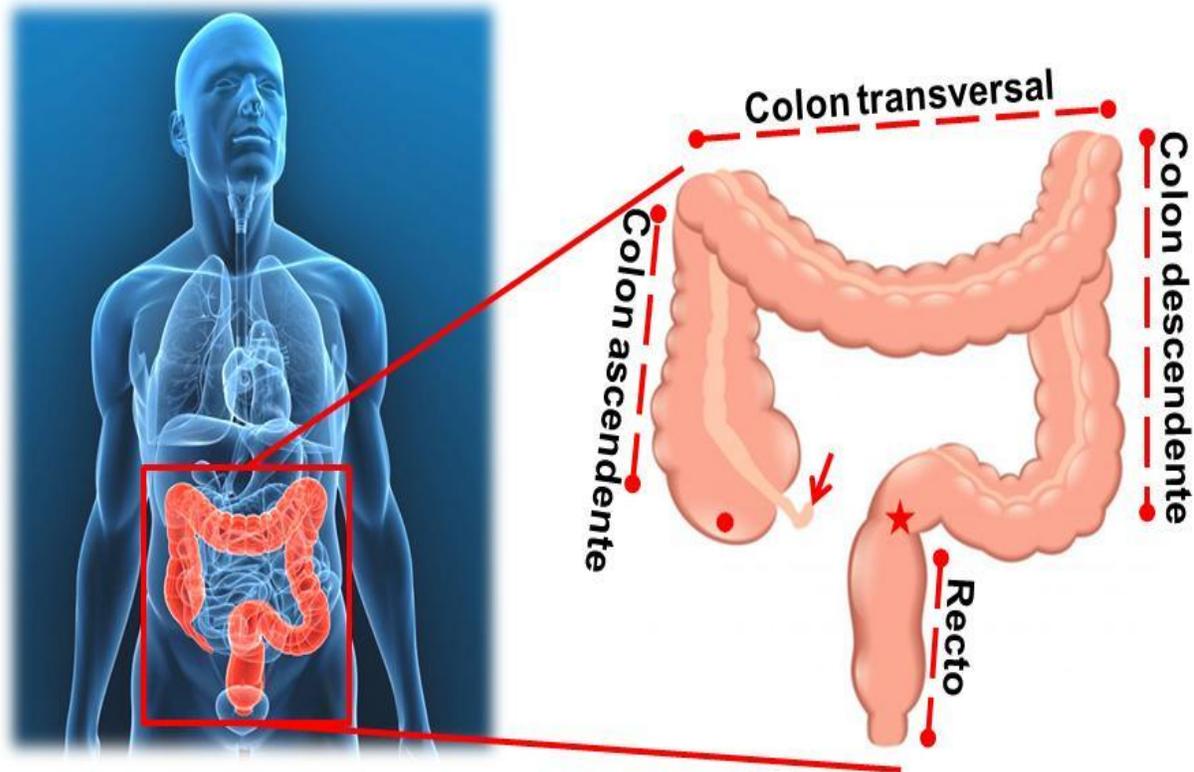


Figura 4. Intestino grueso. Regiones que componen al intestino grueso: ● ciego, → apéndice vermiforme y ★ colon sigmoideo.

Un proceso carcinogénico temprano se manifiesta mediante cambios morfológicos de las criptas que originando criptas aberrantes (CA) (Fig. 5). Éstas se distinguen por el incremento de tamaño, el aumento de la zona pericriptica y por un grueso revestimiento epitelial (Bird R., 1987). Los focos de CA grandes y que exhiben displasia pueden ser llamadas microadenomas (McLellan E. y Bird R., 1988). Una de las características de las CA es la reducción del número o la pérdida de células caliciformes de acuerdo al grado de displasia, por lo tanto la producción de mucina decrece (Sika E. *et al.*, 2011; Fenoglio C. *et al.*, 1981).

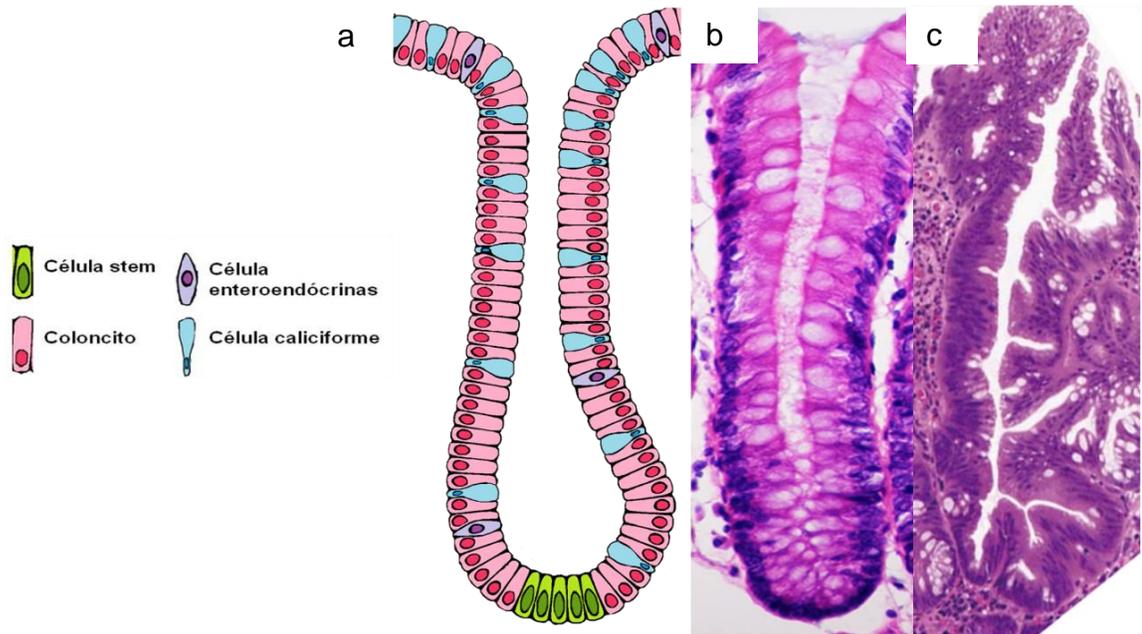


Figura 5. Cripta de Lieberkühn. a) Estructura esquemática de cripta. b) H&E de cripta sana y c) H&E de cripta aberrante.

1.5 El uso de TiO₂ en la dieta: aditivo E171

En la industria alimenticia se usan muchos aditivos, los aditivos alimenticios son sustancias que se agregan en los alimentos que no aportan valor nutricional pero mejoran las propiedades organolépticas. La Unión Europea ha identificado a los aditivos mediante la letra E y un código numérico (EFSA., 2013). El E171 es un material compuesto por dióxido de titanio (TiO₂). Este aditivo se utiliza como colorante blanco en algunos alimentos y dulces, además como enriquecedor de sabor en alimentos no blancos como vegetales secos, nueces, semillas, sopas, mostazas, cervezas y vinos (Peters R., *et al.*, 2014). La FDA (Food and Drug Administration) autorizó el uso de E171 desde 1966 (Faust J. *et al.*, 2014). Este aditivo se compone del 36% de nanopartículas de dióxido de titanio (NPs de TiO₂) con un intervalo de 1 a 100 nm y el 64% restante de micropartículas de TiO₂ (Weir A. *et al.*, 2012). Por lo tanto no se considera un nanomaterial según el criterio de la Unión Europea, ya que no tiene 50% o más de nanopartículas en su composición (European Agency for Safety and Health at Work, 2011). La NPs de TiO₂ tienen tres formas polimórficas principalmente:

anatasa (tetragonal), rutilo (tetragonal) y brookita (ortorrómbica) (Fig. 6) (Barbosa A., *et al.*, 2012). El TiO_2 es un catalizador de la hidrólisis activado por la luz ultravioleta (UV) y se ha visto que aumenta esta propiedad en forma de nanopartículas (Han H. y Ba R., 2009). Además de esta característica, las nanopartículas se usan en la industria de alimentos por su característica de dar gran blancura y como espesante (Becker K. *et al.*, 2014). Por esto su producción aumento en los últimos años a 4 millones de toneladas mundiales y de este el 70% es usado como pigmento (Ortlieb M., 2010).

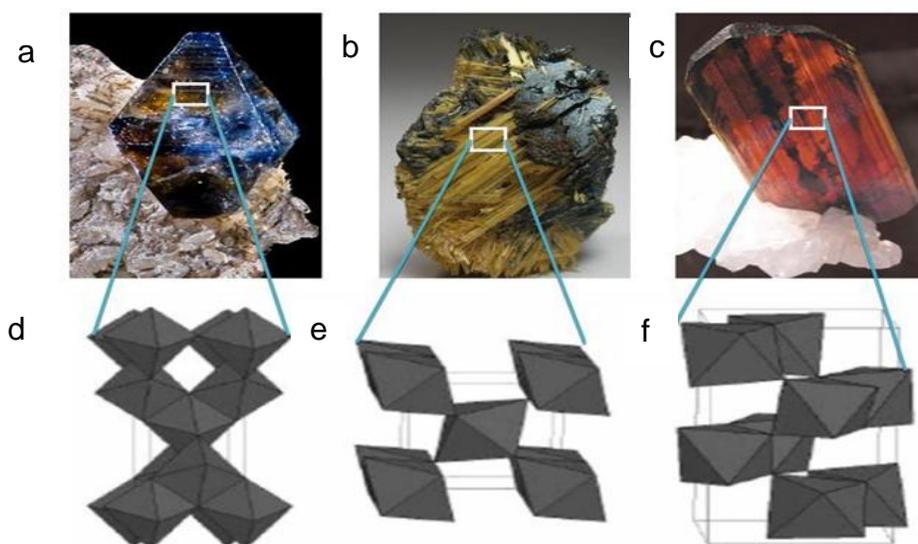


Figura 6. Minerales de TiO_2 . a) Anatasa, b) Rutilo y c) Brookita. d), e) y f) Estructuras cristalinas correspondientes a cada mineral de TiO_2 (Imagen modificada de Barbosa A. *et al.*, 2012).

1.6 Regulación en México sobre el consumo de E171 en alimentos

En México no está bien establecido el límite del uso de dióxido de titanio en los alimentos y muchas normas como la NOM-194-SSA1-2004 y la NOM-243-SSA1-2010 por mencionar algunas, permiten el uso de este material en los alimentos con un límite de buenas prácticas de manufacturación (BPM), esto quiere decir que se puede usar la cantidad mínima necesaria para obtener el efecto deseado (Tabla 2).

Se estima que los niveles de exposición por vía oral del E171 en niños menores de 10 años son de 1-2 mg de TiO_2 /kg de peso por día en Estados Unidos y de 2-3 mg de TiO_2 /kg de peso por día en el Reino Unido. En consumidores de otras edades va de

0.2-0.7 mg de TiO₂/kg de peso por día en Estados Unidos y de 1 mg de TiO₂/kg de peso por día en el Reino Unido (Weir A. *et al.*, 2012).

Tabla 2. Cantidad permitida de E171 en los alimentos por la FDA y las Normas Oficiales Mexicanas

Norma Oficial Mexicana	Usos	Límite	Especificación
NOM-036-SSA1-1993	Helados de leche o grasa vegetal y sorbetes	1000mg/kg	Colorantes con un límite máximo de 100 mg/kg, excepto en TiO ₂
NOM-036-SSA1-1996	Cereales y sus productos, harinas, semillas y productos de panificación	Colorante: 10g/kg Panificación: 10,000mg/Kg	Cuando se utilice mezclas de colorantes la suma no debe exceder 500 mg/kg
NOM-187-SSA1/SCF1-2002	Masa, tortillas, tostadas y harinas	Buenas Practicas de Manufacturación (BPM)	Dosis mínima necesaria para obtener efecto deseado
NOM-194-SSA1-2004	Faenado de animales para abasto	BPM	En aves del genero <i>Gallus</i> que se pigmentan después del sacrificio
NOM-218-SSA1-2004	Bebidas saborizadas no alcohólicas y sus congelados, concentrados para bebidas adicionadas con cafeína	BPM	Pigmento Blanco N°6 y/o C.I.77891
NOM-243-SSA1-2010	Helados, sorbetes, bases de helado, quesos frescos, procesados y cremas	BPM	Pigmento Blanco N°6 y/o C.I.77891
FDA Titanium Dioxide E-171	Puede ser usado en cualquier alimento	No exceder el 1% del peso de la comida	La certificación de E-171 no es necesaria para la protección de la salud pública

Diario Oficial de la Federación; Faust J. *et al.*, 2014

Es importante mencionar que el TiO₂ están clasificadas como posibles carcinógenos para humanos (grupo 2B) por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer cuando su exposición es por vía inhalatoria (Sycheva L. *et al.*, 2009). Se llegó a esta conclusión al evaluar el cáncer de pulmón en ratas expuestas crónicamente a la inhalación de partículas finas de TiO₂ por Lee y colaboradores en 1985 y a partículas ultrafinas por Heinrich y colaboradores en 1995 (IARC Monograph., 2010). Se sugiere que el TiO₂ desarrolla los tumores a través de un mecanismo genotóxico secundario que consiste en la inflamación crónica, la proliferación celular y el estrés oxidativo

(Schins R. y Knaapen A., 2007). Por su parte el Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH por sus siglas en inglés) considera al TiO₂ un cancerígeno potencial ocupacional (Current Intelligence Bulletin 63, CDC., 2014).

1.7 Efecto de la exposición a TiO₂/E171 en modelos experimentales

Se sabe que las E171 se internalizan y se acumulan en los enterocitos del intestino de rata administrados *in situ* (Systemic Absorption of Nanomaterials by Oral Exposure., 2013). Un estudio realizado por Jani y colaboradores en el que se administró una dosis de 12.5 mg/kg de TiO₂ a ratas vía oral por 10 días, demostró que el 4% de la dosis total se deposita en colon, 2.86% en las placas de Peyer y 1.4% en el hígado (Jani P. *et al.*, 1994). En experimentos *in vivo* de exposición intragástrica a NPs de TiO₂ en ratones se ha descrito que causa daños en el sistema digestivo (Bergin I. y Witzmann F., 2013). Li y colaboradores analizaron el daño en bazo causado por NPs de TiO₂ usando dosis de 5, 50 y 150 mg/kg en ratones hembras, ellos observaron una congestión en bazo y la proliferación nódulos linfáticos (Li N. *et al.*, 2010). Cui y colaboradores estudiaron los daños que se generan en el hígado por las NPs de TiO₂ y observaron que los hepatocitos de los ratones tratados con 10 y 50 mg/kg de NPs presentaban grandes vacuolas, necrosis y algunas células inflamatorias infiltrantes (Cui Y. *et al.*, 2010). Gui y colaboradores evaluaron el daño en riñón causado por NPs de TiO₂ administrados intragastricamente y registraron que la expresión de NF-κβ, TNF-α, MIF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IL-1β, CRP, TGF-β, INF-γ y CYP1A1 aumentó de forma dosis-dependiente mientras que HSP-70 y Iκβ decrecieron, sugiriendo una respuesta inflamatoria (Gui S. *et al.*, 2011).

Por otro lado la exposición oral podría exacerbar enfermedades preexistentes en el sistema digestivo o tracto gastrointestinal. Por ejemplo en pacientes con CU, SC y CCR el consumo elevado de alimentos que causen inflamación podría agravar dichos padecimientos. Sin embargo esto aún no está estudiado, pero existen modelos experimentales murinos que podrían contribuir al conocimiento de los efectos del consumo del aditivo E171 en enfermedades preexistentes o en desarrollo como el CCR que es de especial interés para esta tesis.

1.8 Modelo murino de CCR con azoximetano y dextrán sulfato de sodio

Un modelo murino de CCR ampliamente utilizado por su reproducibilidad, su fácil aplicación y que induce los tumores en la parte distal del colon, consistente en lo observado en humanos, es el modelo que utiliza azoximetano (AOM) y dextrán sulfato de sodio (DSS) (Neufert C. *et al.*, 2007).

La inducción de tumores colorrectales puede ser de forma directa o indirecta mediante agentes químicos. Los agentes directos no requieren de ninguna catálisis biológica mientras que los indirectos necesitan de enzimas para activarse (Tanaka T. *et al.*, 2003). Un potente carcinogénico colorrectal indirecto que se ha usado en muchos estudios es el azoximetano que induce cáncer por alquilación de DNA (Soon O. *et al.*, 2001).

El AOM necesita ser metabolizado en el hígado por la isoforma CYP2E1 del citocromo P-450, que mediante una hidroxilación lo transforma en metilazoximetanol (MAM). Este compuesto tiene una vida media de 12 h en condiciones fisiológicas y se conjuga con el ácido glucurónico. El resultado de esta conjugación es el metilazoximetanol- β -D-glucopiranosidurónico (MAM-GlcUA) que es secretado al lumen del intestino junto con las sales biliares (Soon O. *et al.*, 2001; Neufert C. *et al.*, 2007). Debido a varias enzimas de la micro flora como β -glucoronidasa, β -glucosidasa, azorreductasa y nitrorreductasa el MAM-GlcUA se convierte en metildiazonio que es la forma carcinogénica activa (Fig. 6) (Arthur J. y Jobin C., 2011; Matsumoto H. *et al.*, 1979). El AOM en conjunto con dextrán sulfato de sodio (DSS) se utiliza para estudios enfocados al desarrollo de CCR derivado de una enfermedad inflamatoria intestinal (Fig. 7) (Neufert C. *et al.*, 2007).

El DSS es un éster del ácido clorosulfónico del dextrán, es un polímero complejo sintetizado a partir de la sacarosa por varias bacterias (Solomon L. *et al.*, 2010). El DSS induce inflamación del colon por varios mecanismos. Uno es su citotoxicidad, que causa daños en las células epiteliales del colon, dañando la barrera epitelial, por lo

tanto aumentando la permeabilidad de la mucosa del colon (Perse M. y Cerar A. *et al.*, 2012). También mediante la activación de NF- κ B que induce la transcripción de citocinas proinflamatorias además es un activador de linfocitos T y B (Ni J. *et al.*, 1996; Marrero J. *et al.*, 2000).

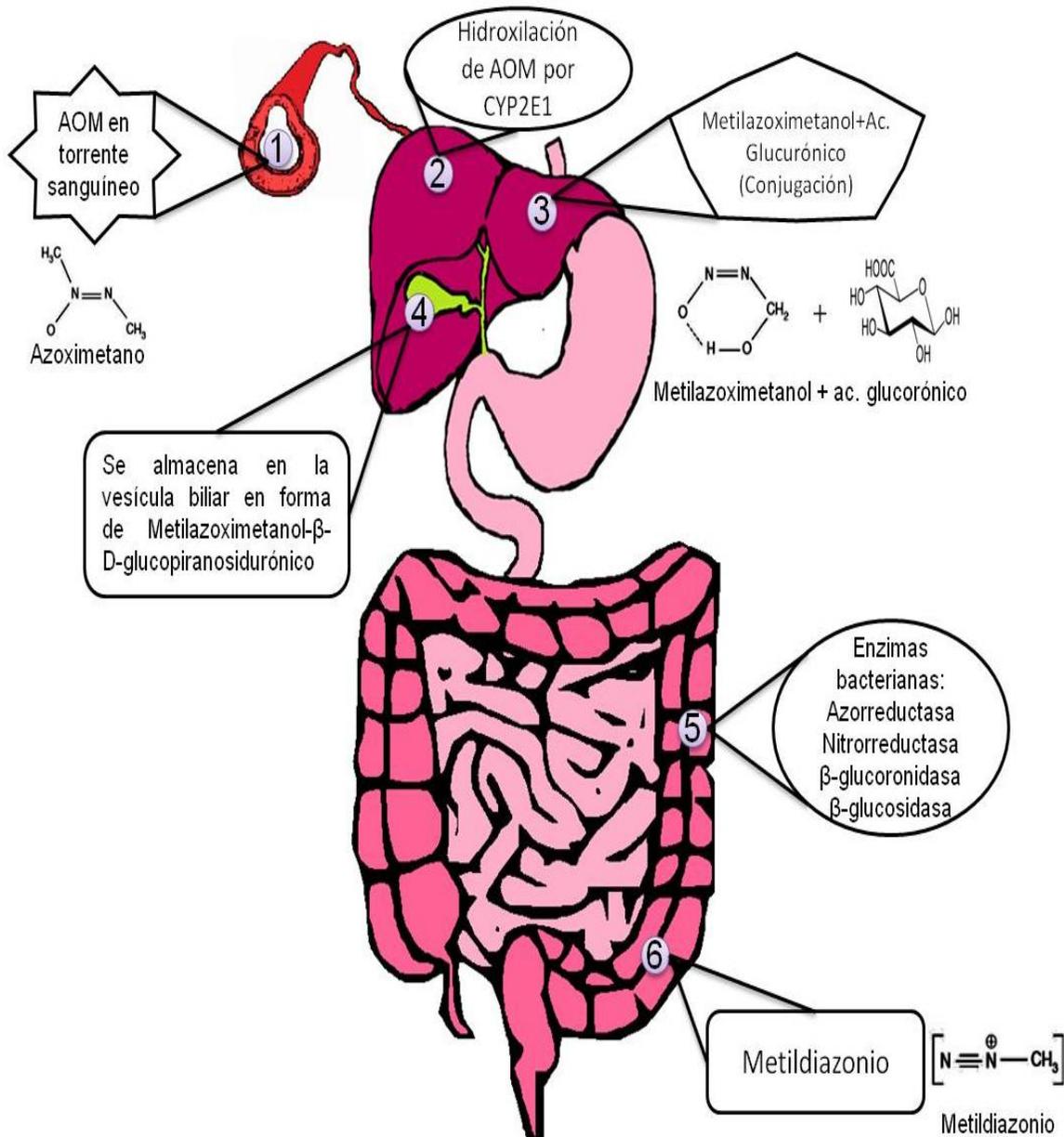


Figura 7. Ruta metabólica del azoximetano (AOM). 1) El AOM al ser inyectado intraperitonealmente llega al hígado vía torrente sanguíneo. 2) El AOM en el hígado es hidroxilado por CYP2E. 3) Posteriormente se conjuga con el ácido glucurónico. 4) En la vesícula biliar se almacena como metilazoximetanol- β -D-glucopiranosidurónico (MAM-GlcUA). 5) y 6) El MAM-GlcUA llega al lumen del intestino, donde las enzimas de la flora intestinal lo convierten en metildiazonio que es la forma carcinogénica.

2. Justificación

El TiO_2 está clasificado en el grupo 2B por la IARC como posible carcinógeno para humanos cuando se está expuesto por vía inhalatoria, mientras que la NIOSH considera actualmente al TiO_2 como cancerígeno potencial ocupacional. El TiO_2 compone al aditivo E171, el cual se emplea en productos alimentarios para el humano y para animales de faenado ya que su uso está permitido por la FDA, EFSA y las normas mexicanas.

Se ha observado que la exposición gástrica a NPs de TiO_2 genera un proceso inflamatorio en tubo digestivo y órganos relacionados al sistema digestivo, entre ellos hígado, riñón y colon pero se desconoce cuáles son los efectos que puede tener la exposición subcrónica o crónica a este aditivo. Tampoco se conoce si dicha exposición podría exacerbar enfermedades gastrointestinales pre-existentes como cáncer colorrectal.

Por lo tanto es importante el estudio de los efectos de las partículas E171 empleando un modelo murino de cáncer colorrectal para conocer las consecuencias de la exposición subcrónica vía gástrica ya que estudios existentes muestran alteraciones en el organismo de los ratones expuestos a estas partículas.

3. Hipótesis

La exposición subcrónica vía intragástrica de las partículas E171 en un modelo murino de cáncer colorrectal exacerbará la expresión de citocinas pro-inflamatorias y disminuirá las anti-inflamatorias, aumentará el número de tumores y provocará una disminución en el número de células caliciformes del colon. Además de que otros órganos como el hígado, riñón y bazo podrían presentar alteraciones morfológicas.

4. Objetivo General

Evaluar el efecto de las partículas E171 en el desarrollo del cáncer colorrectal experimental.

4.1 Objetivos Particulares

Inducir cáncer colorrectal a ratones machos BALB/c.

Cuantificación de consumo de alimento y agua de los ratones durante 42 y 72 días de exposición a partículas E171.

Medir la concentración de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en suero y tejido colónico a los 72 días.

Evaluar las alteraciones estructurales en el hígado y riñón por la exposición a partículas E171 durante 42 y 72 días.

Comparar el número de tumores entre los grupos CCR y CCR+E171 a 72 días.

Comparar el número de células caliciformes a 42 y 72 días de exposición en los grupos: Control, CCR, E171 y CCR+E171.

5. Material y Métodos

5.1 Inducción de CCR

Para este estudio se usaron 24 ratones machos de 4 a 5 semanas de edad BALB/c obtenidos de centro UNAM-Harlan. Los ratones fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos: control (Control) a 42 y 72 días, cáncer colorrectal (CCR) a 42 y 72 días, tratados con partículas E171 (E171) a 42 y 72 días y cáncer colorrectal tratados con partículas E171 (CCR+E171) a 42 y 72 días. Los ratones fueron aclimatados por 1 semana previa al tratamiento. El grupo control recibió una inyección intraperitoneal de solución salina el día de inicio del estudio. El grupo E171 fue administrado intragastricamente con una dosis de 5 mg/kg (Wang J. *et al.*, 2007) durante 10 semanas, de lunes a viernes. Los ratones del grupo CCR recibieron una única inyección de 12.5 mg/kg intraperitoneal de AOM (Sigma-Aldrich Cat. A5486) en un volumen de 0.5 ml (Chen J. *et al.*, 2009). Una semana después los animales recibieron agua para beber con DSS (MP Biomedicals® Cat.160110) al 2% durante 7 días *ad libitum* y posteriormente solamente agua durante las próximas dos semanas siguientes, esto para repetir dos veces el procedimiento con el DSS (Tanaka T., 2009). El grupo CCR+E171 recibió la misma inyección que el grupo CCR y la misma dosis de partículas durante el mismo tiempo. Todo esto se llevó a cabo en 8 y 11, semanas donde al finalizar los animales fueron sacrificados (Fig. 8).

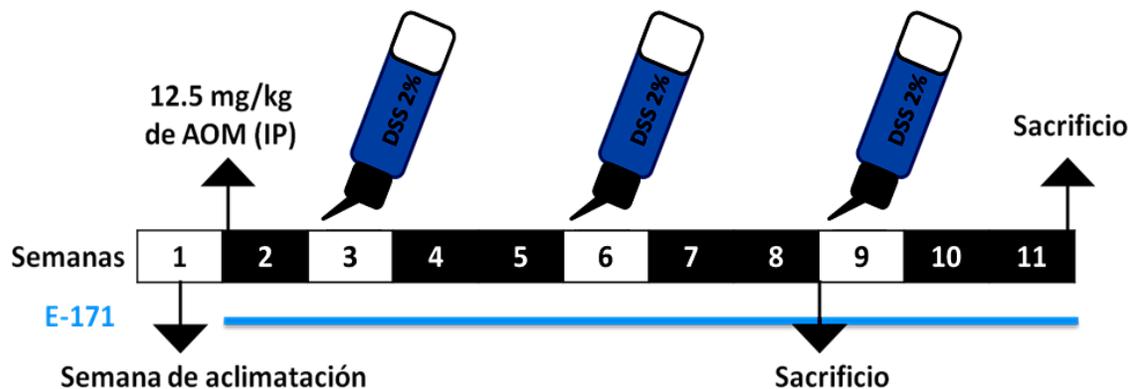


Figura 8. Modelo de AOM/DSS. Aquí se muestran las once semanas y como se administran los ciclos de DSS y la administración intragástrica de E171 durante diez semanas. Cuadros negros indican semanas sin DSS en el agua y cuadros blancos indican semana con DSS en el agua. Línea azul indica las semanas en que las partículas E171 fueron administradas.

5.2 Tinción de hematoxilina y eosina

Los órganos y el colon se fijaron en paraformaldehído al 4% con PBS 1x durante 48 horas. Posteriormente se procesaron para su tinción.

5.2.1 Deshidratación

Se enjuagaron los órganos y el colon con agua corriente durante 30 minutos para retirar el paraformaldehído. Se pasaron por un tren de deshidratación con alcohol etílico que va del 40% al 100% aumentando de 10 en 10 el porcentaje y pasando por alcohol del 96 antes del alcohol absoluto. En los alcoholes del 40% al 60% se dejaron los tejidos 30 minutos en cada disolución de alcohol, en los restantes se dejaron 60 minutos.

Una vez terminado el tiempo en alcohol al 100% se dejaron otros 60 minutos en una mezcla de alcohol con butanol. Terminados estos 60 minutos se dejaron durante 24 horas en butanol al 100%.

5.2.2 Infiltración de parafina

Una vez terminadas las 24 h en butanol, los órganos se colocaron en parafina I durante 24 h a 58°-60° C para quitar los restos del aclarante. Después de esto se colocaron en parafina II a temperatura de 58°-60° durante toda la noche.

5.2.3 Bloques de órganos

En recipientes se vació una delgada capa de parafina, se esperó a que solidifique, se puso el órgano y se llenó el resto con parafina. Los cubos se incubaron a 4° C durante toda la noche. Al siguiente día se desmoldaron.

Antes de realizar los cortes en el micrótopo, los bloques se colocaron en agua con detergente durante 10 minutos a 4° C.

Se hicieron cortes histológicos de 3 µm de espesor de los tejidos embebidos en parafina con la ayuda de navajas de alto perfil (Leica® High-profile disposable blades 818) en un micrótopo (Leica® Mod.RM2125RTS).

5.2.4 Tinción de hematoxilina y eosina

Los portaobjetos donde se colocaron los cortes se pusieron toda la noche a 60° C para quitar los restos de parafina.

Posteriormente se pasaron por un tren de hidratación que consiste en 5 minutos en xilol I más 5 minutos en xilol II. Después durante 3 minutos por una mezcla 1:1 de alcohol absoluto y xilol. Se colocaron durante 3 minutos en alcohol absoluto y dos minutos en alcohol al 90% y 80%. Se dejó 1 minuto en el último alcohol al 70% y se enjuagaron durante 3 minutos en agua de grifo.

Para la tinción de los cortes se tiñeron durante 5 minutos en hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich®, Cat.HHS16), se enjuagaron en agua de grifo y se dejaron 60 segundos en agua amoniacal al 1% y se volvieron a enjuagar con agua de grifo.

Acabado de enjuagar se pusieron en eosina (Sigma-Aldrich®, Cat.E4009) durante 4 minutos y se enjuagaron con agua de grifo.

El tejido fue nuevamente deshidratado. Fueron pasados por alcohol al 70% y 90% por 1 minuto, alcohol al 100% por cuatro minutos y por xilol I y xilol II durante 5 minutos en cada uno. Al finalizar la tinción a las laminillas se les colocó un cubreobjetos con medio de inclusión rápida (Entellan® Cat.1079610500) para su posterior observación al microscopio.

5.3 Cuantificación histológica de células caliciformes

Se hicieron cortes histológicos de 3 µm de espesor de la parte distal del colon embebido en parafina con la ayuda de navajas de alto perfil (Leica® High-profile disposable blades 818) y micrótopo (Leica® Mod.RM2125RTS). Los cortes se tiñeron con Alcian Blue (Sigma-Aldrich®, Cat.05500) y Nuclear Red Fast.

El colorante Alcian Blue (Sigma-Aldrich®, Cat.05500) se preparó poniendo 1 g en una solución de ácido acético al 3%. Posteriormente se mezcló y se ajustó el pH a 2.5 usando el ácido acético. Para preparar el Nuclear Red Fast se disolvieron 0.2 g en 200 mL de solución acuosa de sulfato de aluminio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{H}_2\text{O}$) al 5% hirviendo. Se dejó hervir durante 5-10 minutos y se filtró después de enfriar.

El colon se procesó de forma similar a como se procesaron para la tinción de hematoxilina y eosina. Una vez obtenidos los cortes y que las laminillas se dejaron a 60° C toda la noche se tiñeron con Alcian Blue (Sigma-Aldrich®, Cat.05500) y Nuclear Red Fast de la siguiente manera:

Los cortes se dejaron en la solución de Alcian Blue durante 10 minutos, posteriormente se enjuagaron en agua de grifo por dos minutos y por segundos en agua destilada. Después se pusieron los cortes en la solución de Nuclear Red Fast durante 10 minutos. Posteriormente se enjuagaron de la misma manera, dos minutos en agua de grifo y algunos segundos en agua destilada.

Al finalizar la tinción las laminillas se les colocó un cubre objetos con medio de inclusión rápida (Entellan® Cat.1079610500) para su posterior observación al microscopio y conteo de las células caliciformes por seis personas las cuales no sabían de qué grupo era cada muestra.

5.4 Medición de citocinas en suero

El sacrificio de los animales se hizo mediante decapitación. Se colectó la sangre en tubos de micro-centrífuga de 1.5 mL. Se dejó coagular durante 15 minutos y el suero se colectó centrifugando a 2500 rpm durante 10 minutos. Mediante el ensayo de ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas por sus siglas en inglés) se determinó los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-10 en el suero.

Procedimiento del ensayo de ELISA:

5.4.1 Sensibilización de la placa

Se diluyó el anticuerpo de captura a una concentración de 2 μ g/mL en 10 ml de PBS 1x. De esta disolución se agregó 100 μ L a cada pozo de la placa para ensayo de ELISA (Nunc MaxiSorp® flat-bottom 96 well plate). La placa se cubrió para evitar la evaporación y se dejó en incubación toda la noche a 4° C.

5.4.2 Bloqueo

Se llevó a temperatura ambiente la placa y se removió el anticuerpo de captura lavando 4 veces con PBS 1x/Tween (Química Meyer Cat.TW0250). La placa se secó en un papel absorbente y se agregaron 200 μ L de buffer bloqueador (PBS 1x/BSA 1%) por pozo, para bloquear las uniones no específicas. La placa se cubrió e incubó 2 horas a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo la placa se lavó PBS 1x/Tween.

5.4.3 Curva y muestra

Se agregaron 100 μ L de los estándares de la curva y de las muestras de suero. Se cubrió la placa y se incubó toda la noche a 4° C. Posteriormente se lavó 4 veces con PBS 1x/Tween.

5.4.4 Detección

Se diluyó el anticuerpo biotilnado (α -citocina) a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS 1x y se agregaron 100 μL de la disolución a cada pozo, se cubrió la placa y se dejó en incubación una hora a temperatura ambiente. Al finalizar la hora se lavó tres veces con PBS 1x/Tween. Se diluyó la estreptavidina a 1:4000 en buffer de bloqueo (PBS 1x con BSA 1%) y se colocó 100 μL por pozo. Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Al finalizar el tiempo se lavó 5 veces con PBS 1x/Tween. El sustrato ABTS se preparó con 20 minutos de anticipación antes de su uso. Al finalizar los 5 lavados se agregó 100 μL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% a 11 mL de ABTS y se mezcló. Inmediatamente se agregó 100 μL en cada pozo y se incubó a temperatura ambiente 15 minutos. La placa se leyó a 405 nm en el espectrofotómetro de microplacas (Biotek, Mod. Epoch. N° Serie 1209165)

5.5 Medición de citocinas en colon mediante lector Bio-Plex multiplex MAGPIX

Se maceró 0.15 g de tejido de colon para la detección de citocinas en los 4 grupos. La cuantificación de IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ y TNF- α se realizó utilizando un lector de multiplex (Lector Bio-Plex multiplex MAGPIX, Texas, EE.UU.) con un kit de Bio-Plex Pro citocinas para ratón 8-plex según las instrucciones del fabricante. Se agregaron 50 μL de microesferas por pozo en una placa de 96 pozos, y se lavó dos veces con 100 μL de buffer de lavado. La muestra se diluyó 1:4 y 50 μL se añadieron a una microplaca, que se incubó con agitación (850 ± 50 rpm) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente la microplaca se lavó tres veces con 100 μL de buffer de lavado y se incubaron con 25 μL de anticuerpos del kit en las mismas condiciones y se lavó tres veces. Posteriormente 50 μL de estreptavidina se añadieron por pozo, se incubó y se lavó en las mismas condiciones. Finalmente se añadieron 125 μL por pozo de buffer de ensayo y la microplaca se leyó.

5.6 Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias significativas, los resultados se analizaron por medio de una prueba no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, utilizando el programa GraphPad Prism® 5 (Graph Pad Software).

6. Resultados

6.1 Consumo de agua y alimento

Se monitoreó el consumo de alimento y agua en los ratones durante los 3 ciclos de DSS. No hubo diferencias en la ingesta de comida ni en el consumo de agua. Se observa una inclinación de menor consumo de alimento en el grupo de CCR+E171 a los 72 días (Fig. 9). En el consumo de agua se obtuvo el mismo patrón de consumo en todos los grupos (Fig. 10).

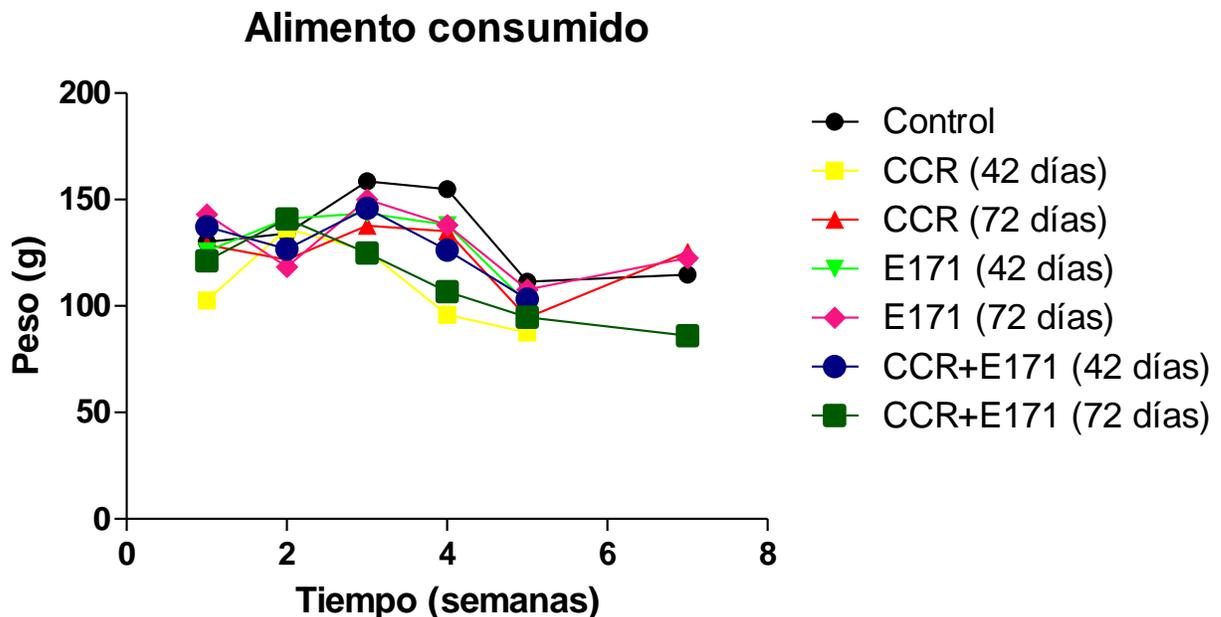


Figura 9. Gráfica de consumo de comida. No hay diferencias significativas entre los grupos en su consumo de alimento, solo se ve una tendencia de bajo consumo en el grupo CCR+E171 a los 72 días.

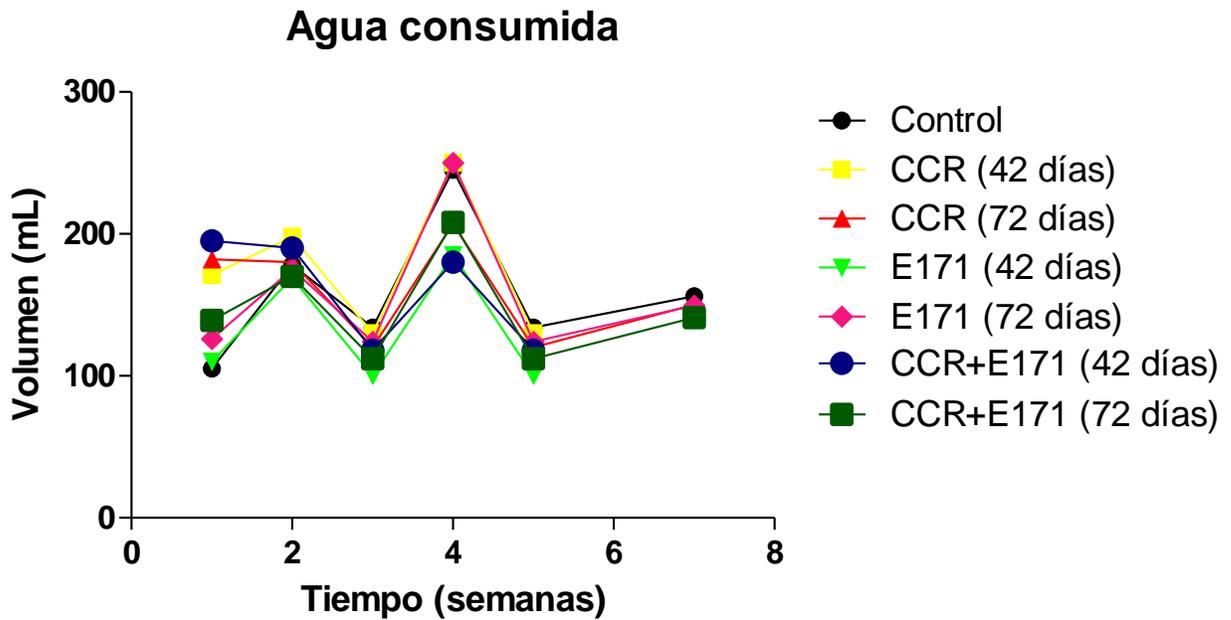


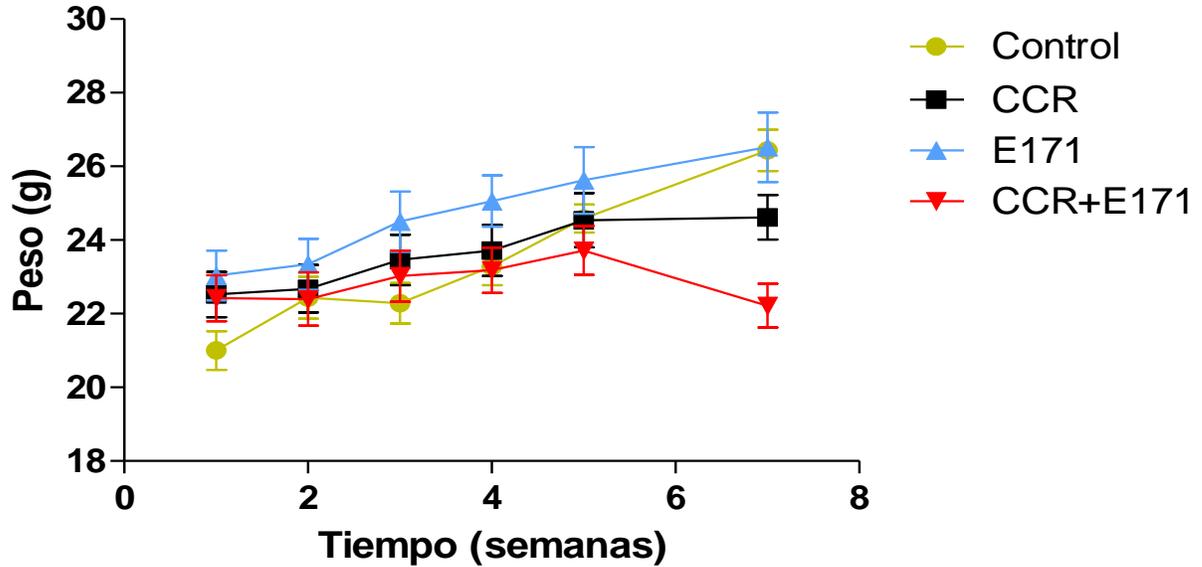
Figura 10. Gráfica de consumo de agua. No hay diferencias significativas en ningún grupo.

6.2 Peso de ratones

Con respecto al peso de los ratones hubo menos ganancia de peso en los grupos de CCR y CCR+E171 aunque sin valores significativos, solo se observó una inclinación de cómo los ratones pertenecientes a esos dos grupos tuvieron una ganancia de peso menor (Fig. 11).

A

Peso de ratones con CCR y E171 a 8 semanas



B

Peso de ratones con CCR y E171 a 11 semanas

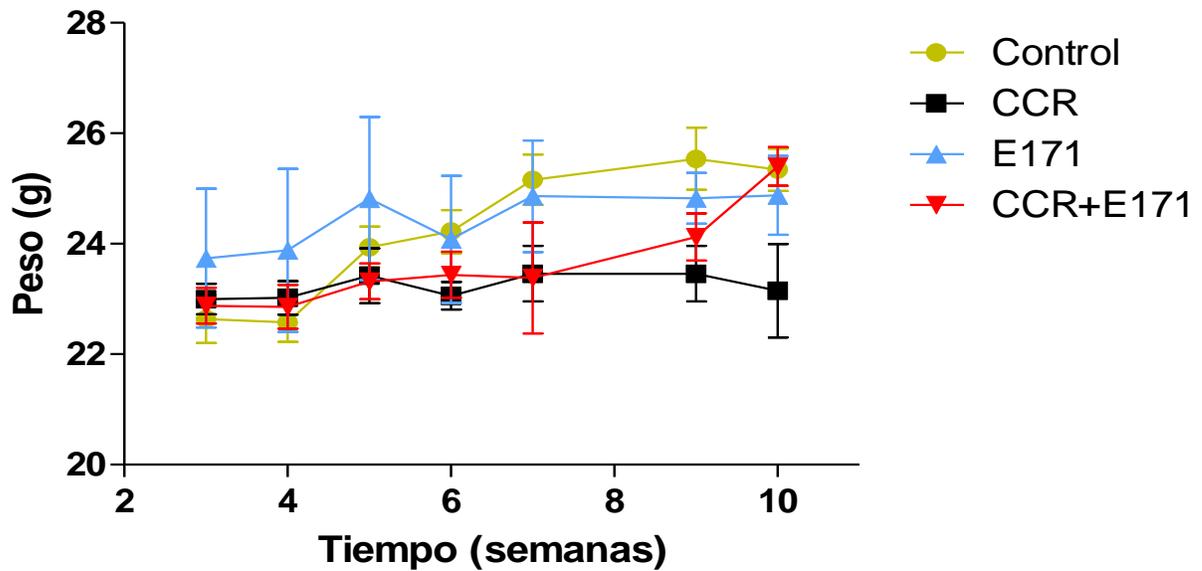


Figura 11. A) Gráfica del peso de los 4 grupos de ratones a 8 semanas. B) Gráfica del peso de los 4 grupos de ratones a 11 semanas.

6.3 Daños estructurales en órganos a 42 y 72 días

El peso del hígado del grupo E171 a los 42 días tuvo diferencias con respecto al control a los 42 días, los demás no tuvieron diferencias significativas en el peso, siendo este de 1 a 1.5 g en todos los grupos (Fig. 12). En los grupos que fueron expuestos a las partículas E171 se observan células de Kupffer hiperplásicas en los cortes histológicos (Fig. 13).

En los cortes histológicos realizados a riñón a 72 días, se observan depósitos de proteínas en el grupo CCR+E171 (Fig. 14). El riñón de los ratones a los 42 días no presentó cambios en el peso, entre los grupos. Pero a los 72 días en los riñones del grupo CCR+E171 tuvieron una importante pérdida de peso, perdiendo 73% de la masa renal comparada con el control (Fig. 15). Se midió creatinina y urea en suero para evaluar un daño fisiológico al riñón, ya que estos dos son marcadores de función renal, pero no hubo diferencias significativas con los tratamientos. Por lo tanto según estos marcadores no hubo daño renal fisiológico, solo hubo una pérdida de masa del órgano (Fig. 16).

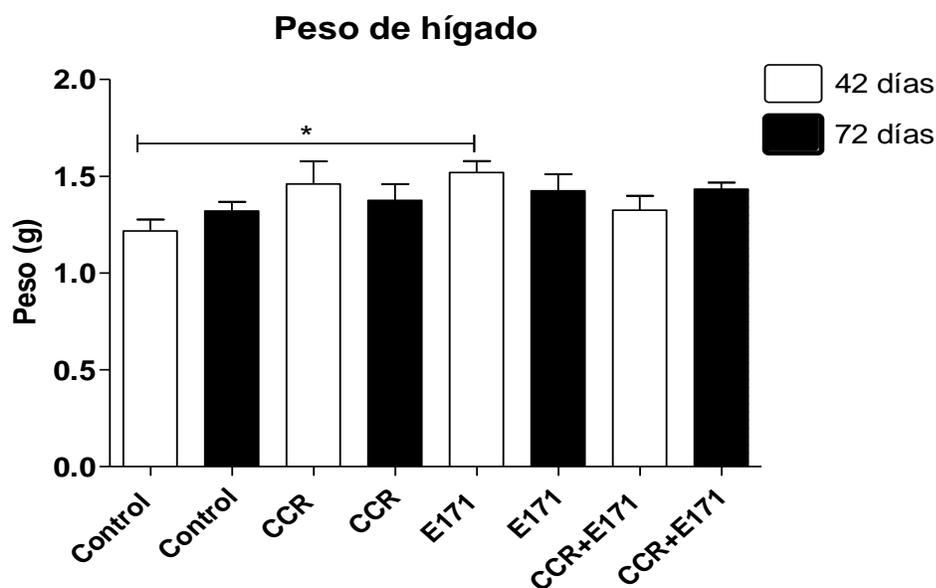


Figura 12. Peso de hígado de los 4 grupos de ratones evaluados a 42 y 72 días. Se observa una diferencia de peso entre el control y el grupo CCR a las 42 días. No se observa diferencias significativas a los 72 días en el hígado en los 4 grupos. $P < 0.05\%$ Mann-Whitney.

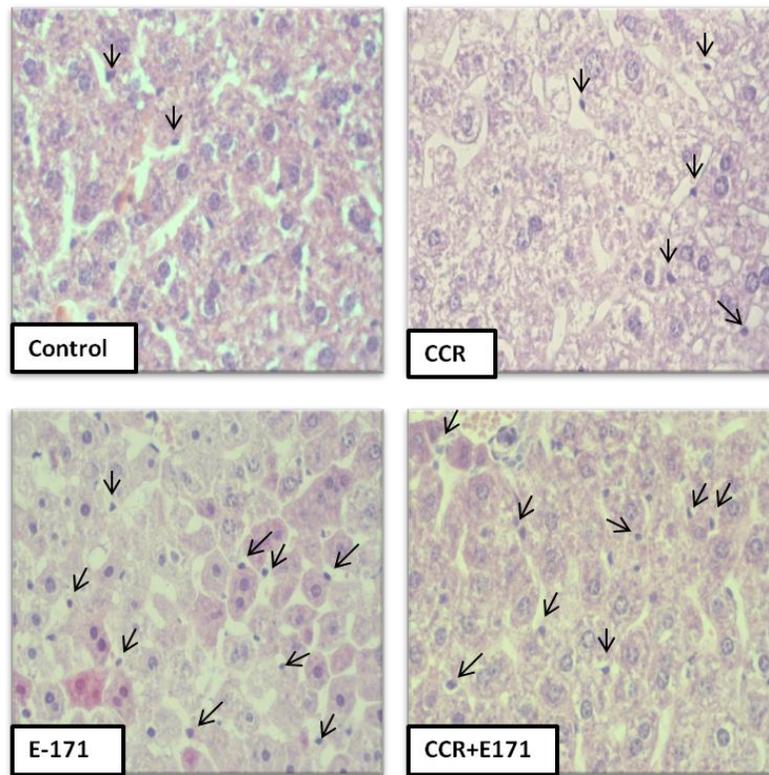


Figura 13. Tinción H&E de hígado. Con flechas se indican las células de Kupffer.

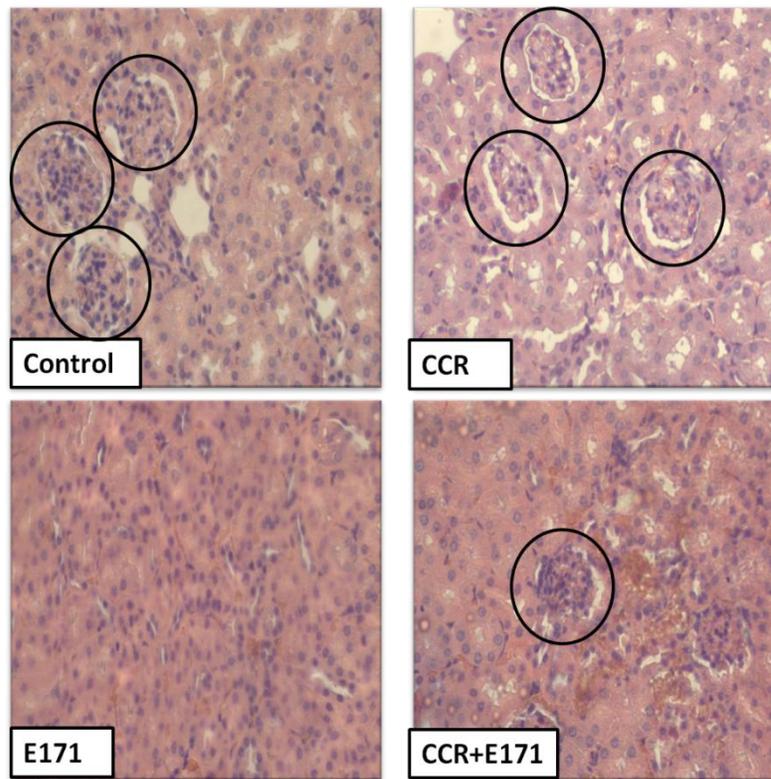


Figura 14. Tinción H&E de riñón. Círculos marcan los glomerulos.

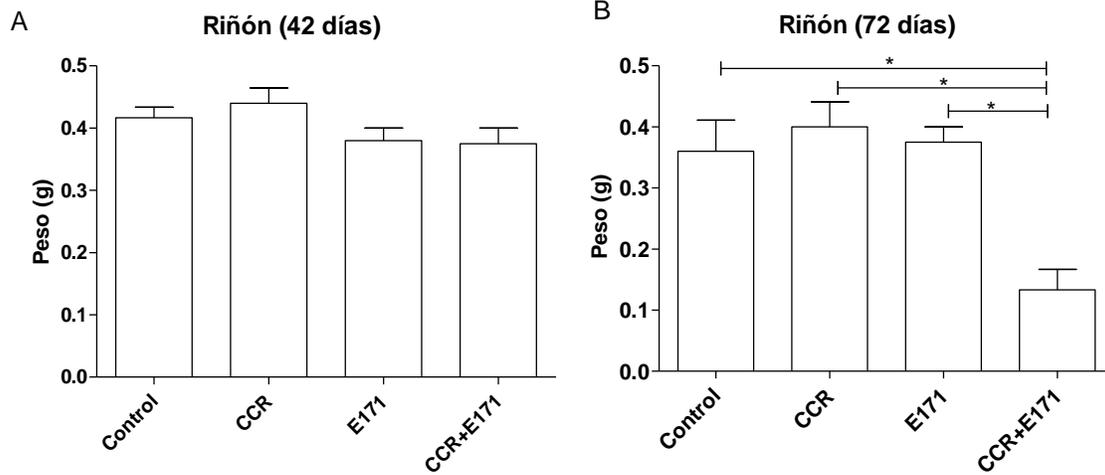


Figura 15. Peso de riñones de los 4 grupos de ratones evaluados a 42 y 72 días. En (a) se observa el peso del riñón a los 42 días y no hay diferencias significativas entre los grupos. En (b) se ve el peso de los riñones a los 72 días donde se observa la significativa pérdida de peso en el grupo CCR+E171. $P < 0.05\%$ Mann-Whitney.

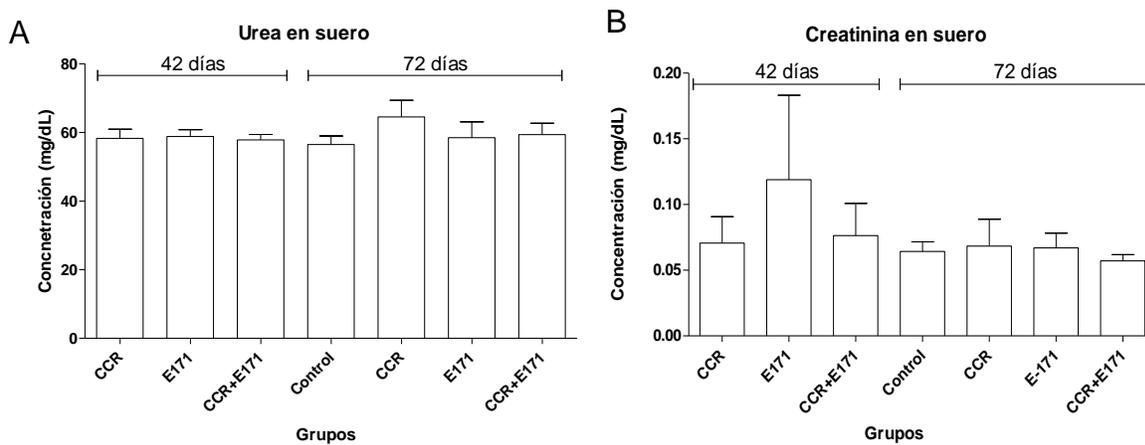


Figura 16. Niveles de (a) creatinina y (b) urea. No hay diferencias significativas en ningún tratamiento. $P < 0.05\%$ Mann-Whitney.

El bazo se pesó ya que es un órgano que se ve dañado cuando se administran NPs de TiO_2 intragástricamente. No se encontraron diferencias significativas en el peso de este órgano comparándolos con el control a los 42 días ni a los 72 días (Fig.17).

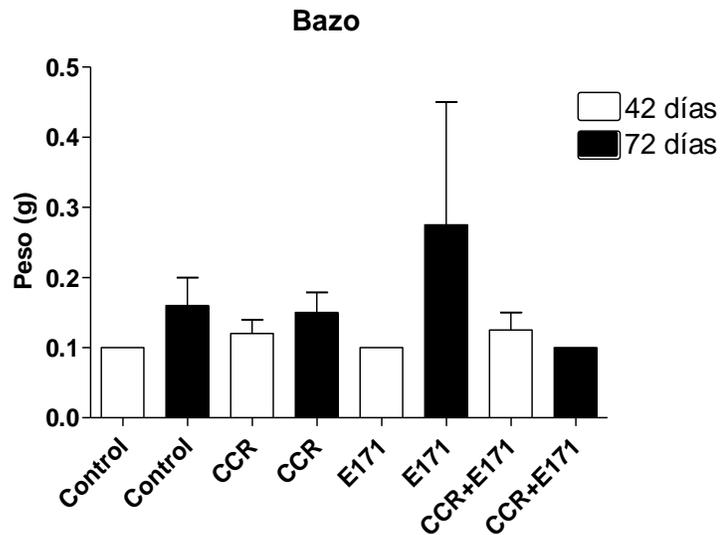


Figura 17. Peso del bazo. Se observa el peso de los bazos a los 42 y 72 días y no hay diferencias significativas entre los grupos. $P < 0.05\%$ Mann-Whitney.

6.4 Peso y longitud del colon

Los grupos a los cuales se les indujo cáncer, el colon tiene mayor peso, que va de 0.5 a 0.6 g que los grupos a los cuales no se les indujo el cáncer, los cuales tienen un peso de 0.4 ± 0.1 (Fig. 18). En los grupos CCR y E171 a los 42 días hubo una disminución significativa en el peso con respecto al control. La longitud del colon no fue afectada; tienen la misma los cuatro grupos en los diferentes tiempos, no hubo diferencias significativas. A los 72 días el grupo CCR peso significativamente más que el control, en los demás grupos no hubo cambios. Su longitud fue de 10 ± 1 cm a los 72 días y 8 ± 1 a los 42 días.

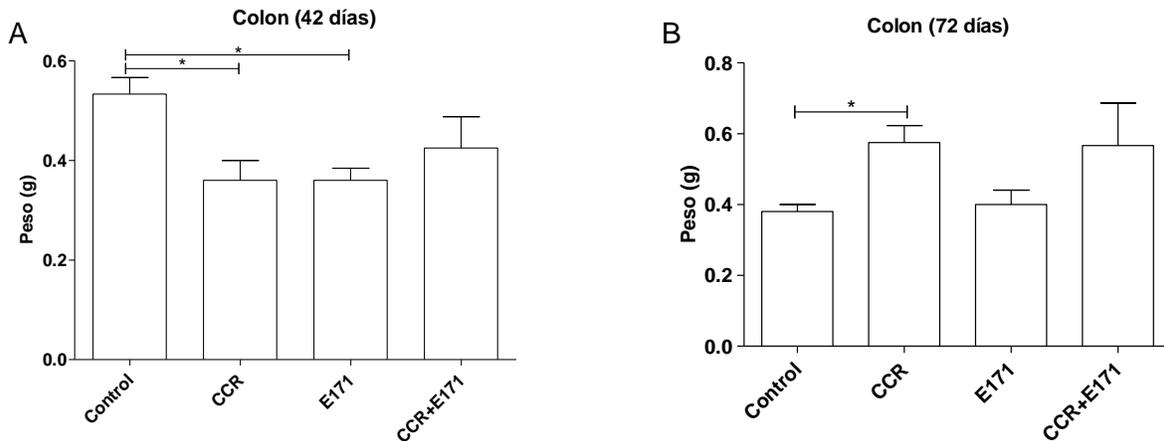


Figura 18. Peso de colon. Diferencias de peso entre los grupos., a) en 42 días e observaron diferencias significativas entre el peso del grupo CCR y E171 con respecto al control, b) a los 72 solo un aumento de peso significativo en el grupo CCR respecto al control $P < 0.05\%$ Mann-Whitney.

6.5 Citocinas en suero y colon

Se midió los niveles séricos de la citocina anti-inflamatoria IL-10, se observó una disminución en los grupos CCR y CCR+E171 comparados con el grupo E171 (Fig. 19).

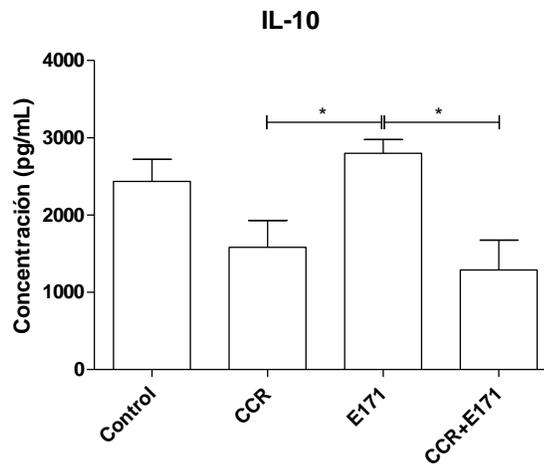


Figura 19. Niveles de IL-10 en suero a 72 días. Los grupos CCR y CCR+ E171 son significativamente más bajos comparados al grupo E171 pero no al control. Aunque no hay diferencia entre el grupo CCR y CCR+E171. $P < 0.05\%$ Mann-Whitney.

La citocina IL-6 tiene una disminución significativa en su concentración en niveles séricos en el grupo CCR+E171 comparándose al grupo control y CCR. TNF- α , citocina pro-inflamatorias relacionadas entre si, no mostraron diferencias en sus niveles séricos en ningún grupo (Fig. 20).

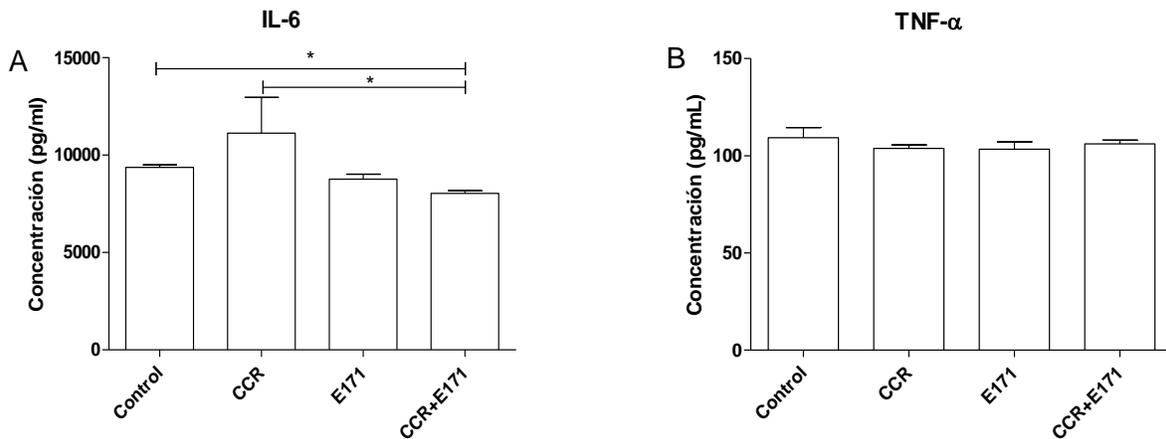
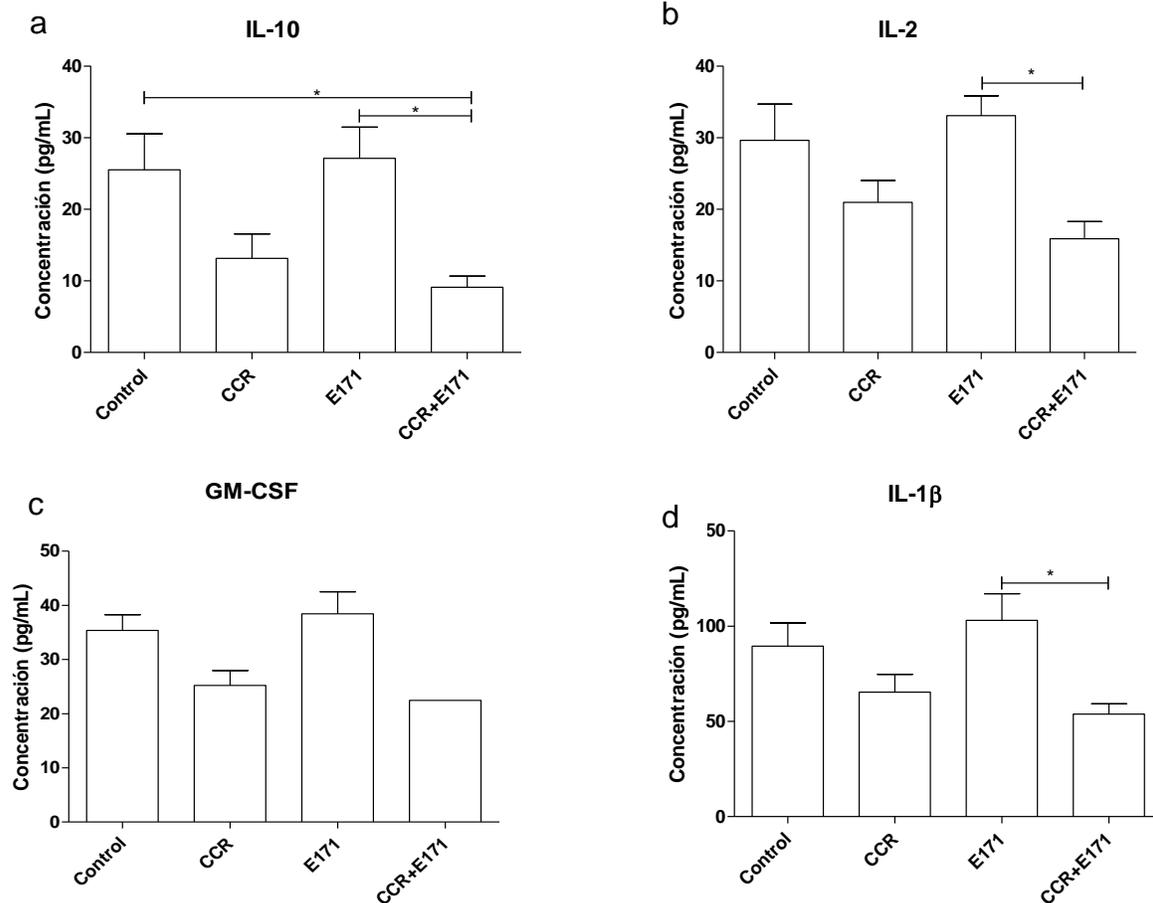


Figura 20. Concentración de citocinas en suero de grupos a 72 días. a) el grupo CCR+E171 tienen un disminución en IL-6. No hay cambios significativos en la concentración de TNF-α. P<0.05% Mann-Whitney.

Las citocinas pro-inflamatorias IL-1b, INF-γ y TNF-α no tuvieron cambios significativos, solo el grupo CCR-E171 tuvo una disminución a comparación del control, por lo cual no hay perfil de inflamación.



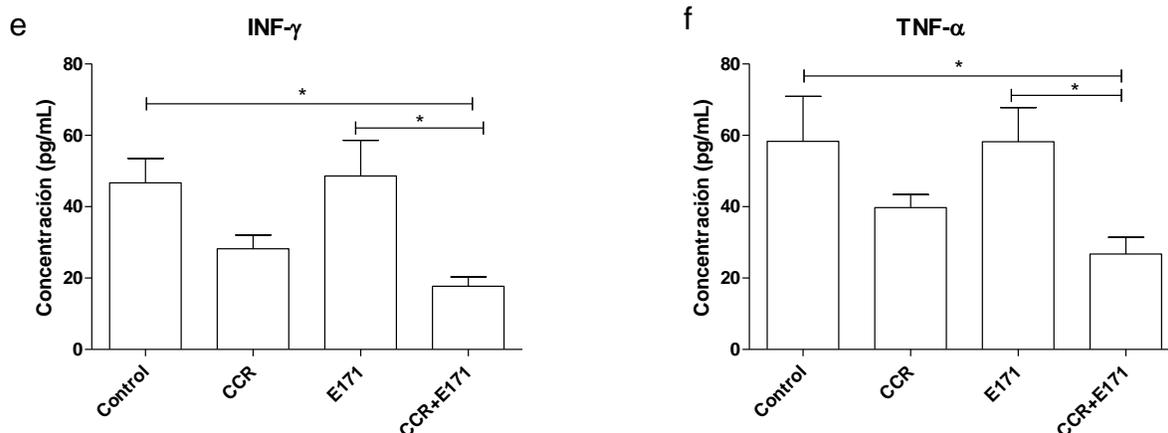


Figura 21. Concentración de citocinas en colon de los cuatro grupos a los 72 días. Solo encontramos diferencias significativas en la figuras a,b y d, donde la expresión es menor significativamente en el grupo CCR+E171 respecto al grupo E171. $P < 0.05\%$ Mann-Whitney.

6.6 Número de tumores en colon

El colon de los ratones del grupo CCR tuvo un promedio de 5 ± 1.2 de tumores, que sólo se presentaron en la parte distal del colon. El grupo CCR+E171 tuvo un mayor número de tumores, un promedio de 20.2 ± 3.9 , siendo 4 veces más. En este último grupo los tumores se encontraban de la parte distal hasta la parte media, eran más pequeños que en el grupo de CCR pero más abundantes (Figs. 22, 23, 24 y 25).

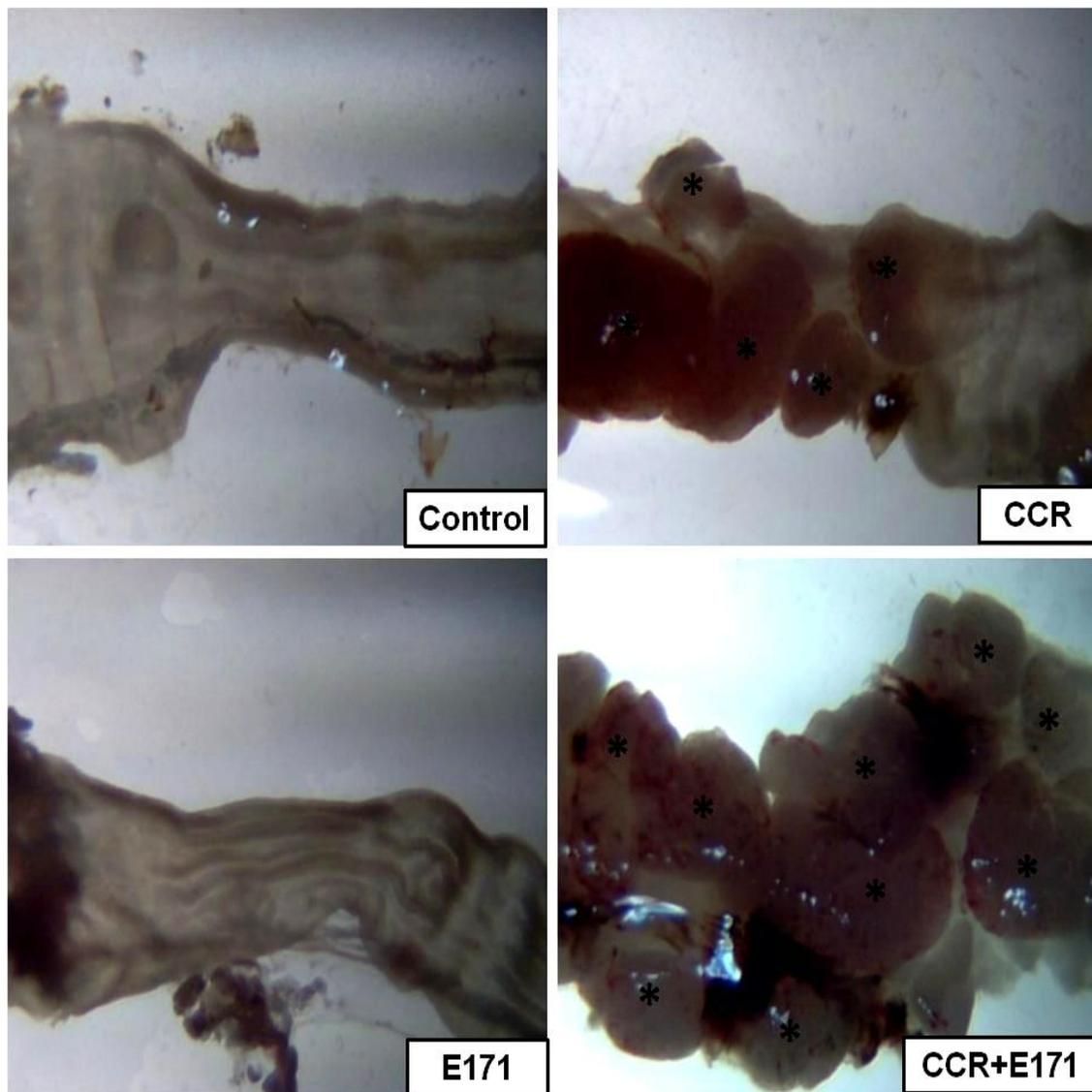


Figura 22. Parte media del colon. Los asteriscos indican los tumores. Los grupos control y E171 no presentan ningún tumor. Los grupos CCR y CCR+E171 son los únicos con tumores.

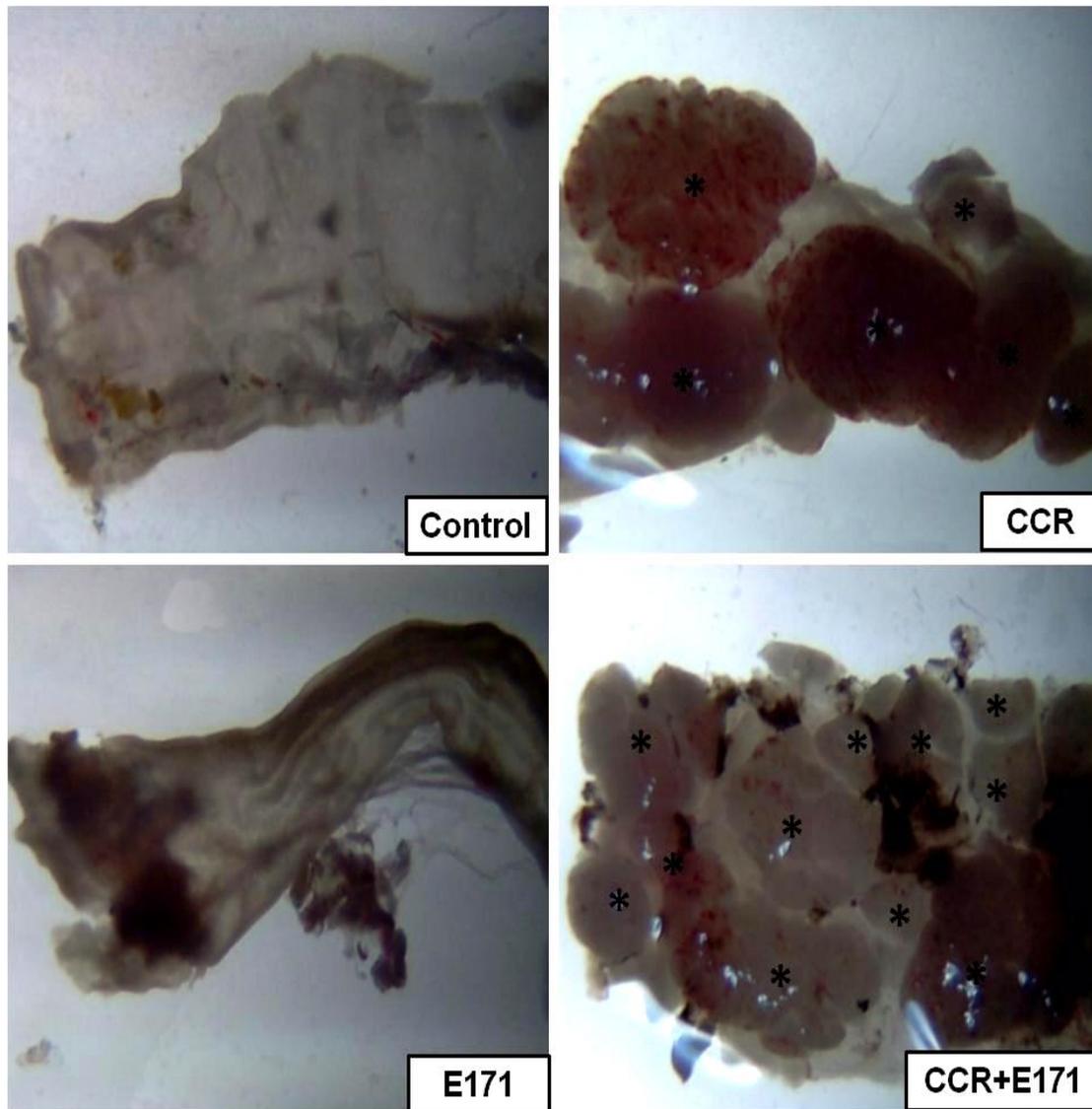


Figura 23. Parte distal del colon. Los grupos control y E171 no presentan ningún tumor. Los grupos CCR y CCR+E171 tiene tumores y como se alcanza a ver en el grupo CCR son mas grandes pero menos numerosos pero en el grupo CCR+E171 hay más tumores, aunque más pequeños.



Figura 24. Representación de colon completo diseccionado. El grupo CCR presenta tumores solo en la parte distal del colon mientras que el grupo CCR+E171 tiene tumores desde la parte distal hasta la parte media del colon.

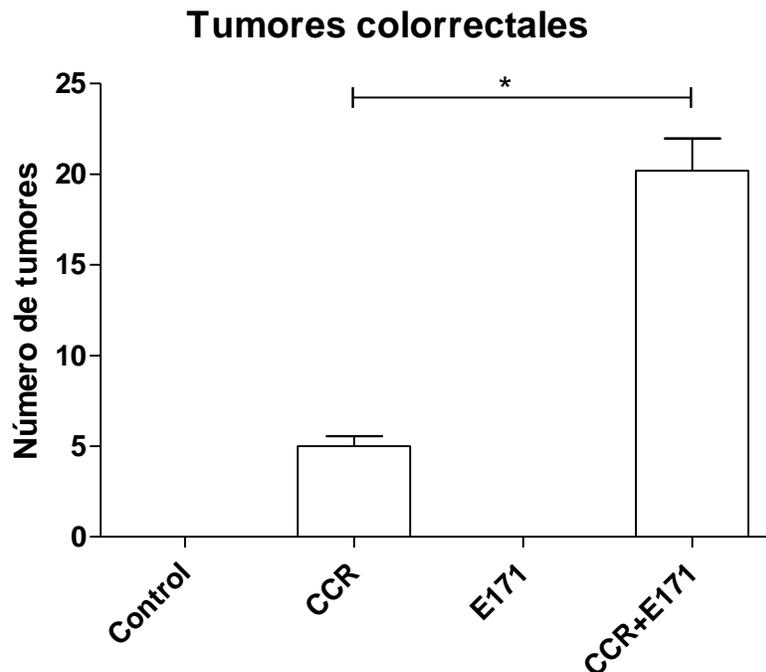


Figura 25. Número de tumores en la parte distal del colon de ratones. El grupo control y E171 no tuvieron ningún tumor. En los grupos CCR y CCR+E171 si hubo tumores y fueron más abundantes en el grupo CCR+E171. $P < 0.05\%$ Mann-Whitney.

6.7 Daños histológicos en el epitelio del colon

En el grupo E171 la estructura de las criptas se perdió, además de que hubo un engrosamiento de la capa mucosa. Hubo infiltración de líquido en el tejido provocando un edema entre la submucosa y la capa muscular. A las once semanas los adenocarcinomas polipoides se desarrollaron en el grupo CCR. La capa mucosa se observó muy crecida en comparación al control, la estructura de las criptas se perdió. En el grupo CCR+E171 no tuvo ningún engrosamiento de la mucosa ni se presentó edema pero hay formación de adenocarcinomas polipoides (Fig. 26 y 27).

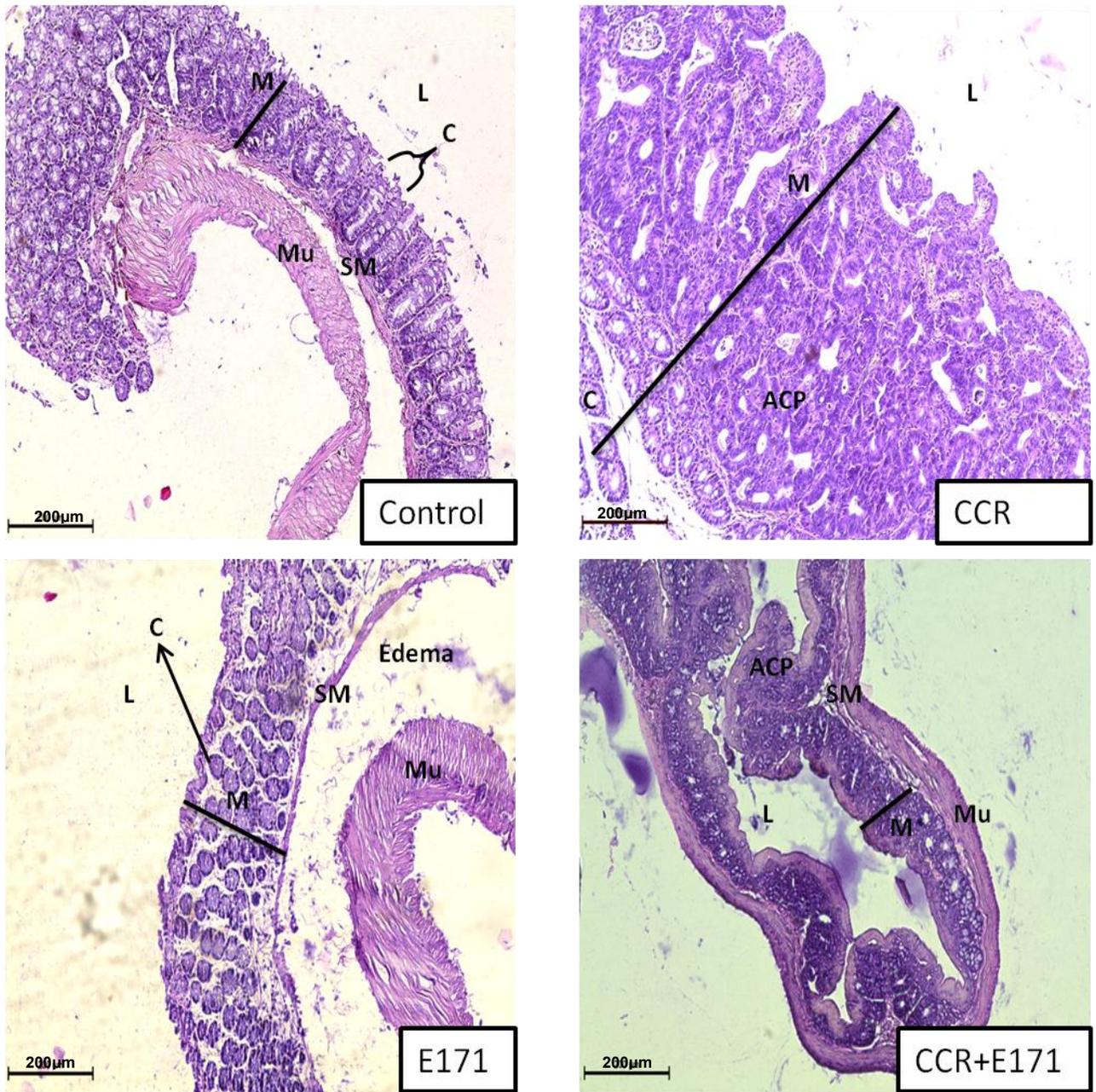


Figura 26. Cortes histológicos de colon con tinción H&E a 10x. Se puede ver la estructura de un colon sano en el control, que se compone de la mucosa (M) y en ella las criptas de Lieberkühn (C), de la submucosa (SM) y de la capa muscular. En el grupo CCR solo se observa la mucosa ya que el engrosamiento de esta capa se dio por la formación de un adenocarcinoma polipoide (ACP). En el grupo E171 se observa un leve engrosamiento de la capa mucosa y la pérdida de la estructura de las criptas, pero se presenta un gran edema ente la submucosa y la muscular. El grupo CCR+E171 no tiene edema pero presenta varios ACP. (M) mucosa, (Mu) muscular, (SM) submucosa, (C) cripta, (L) lumen y (ACP) adenocarcinoma polipoide.

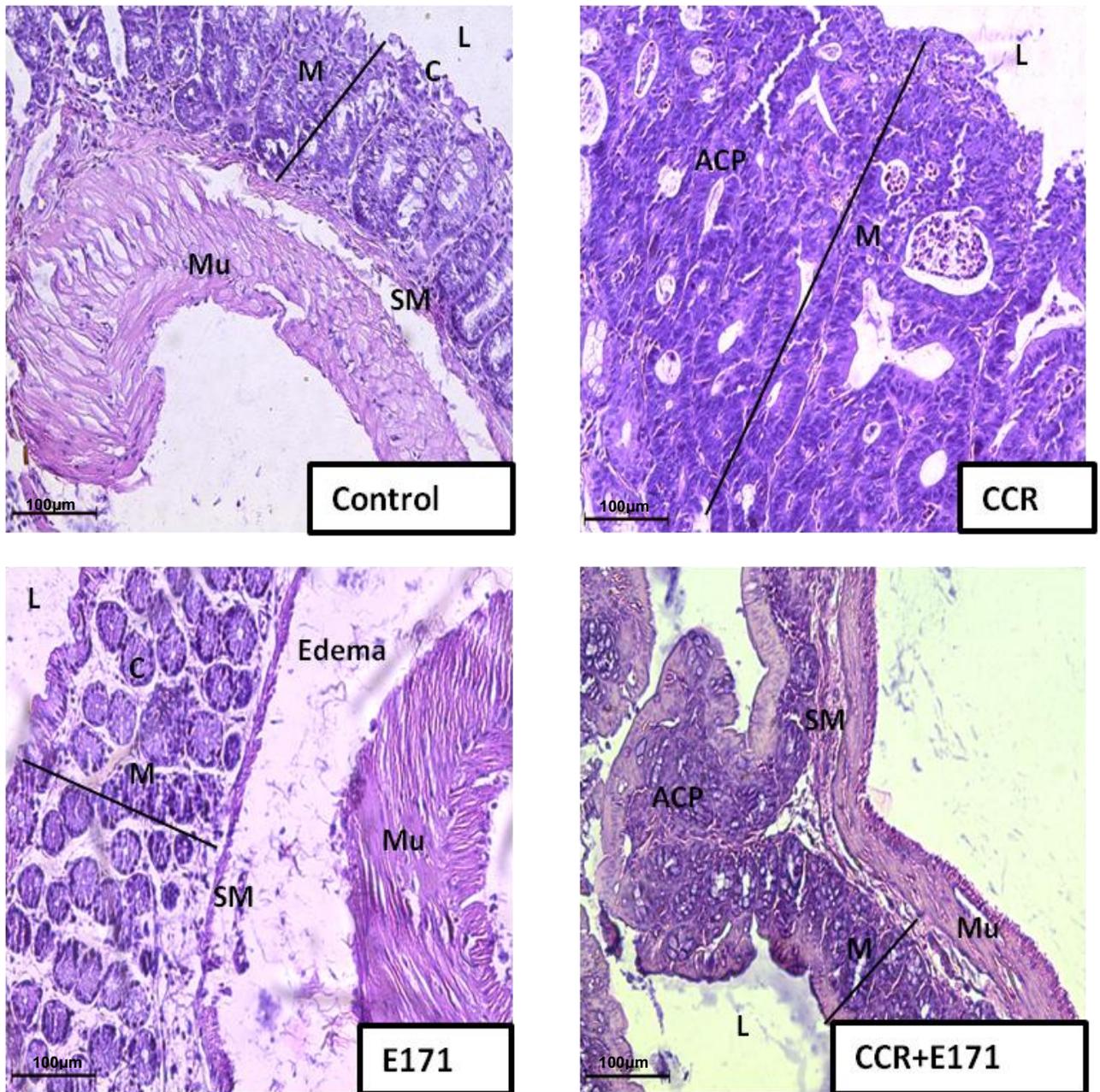


Figura 27. Cortes histológicos de colon con tinción H&E a 20x. Aquí se pueden observar a un mayor aumento las estructuras ya antes mencionadas. Se puede observar con más detalle la pérdida de la estructura de las criptas y la deformación de la capa mucosa. (M) mucosa, (Mu) muscular, (SM) submucosa, (C) cripta, (L) lumen y (ACP) adenocarcinoma polipóide.

6.8 Disminución del número de células caliciformes en el colon

El número de células caliciformes tuvieron una disminución. El grupo control conserva la arquitectura sana del colon y un gran número de estas. El grupo CCR, E171 y CCR+E171 a 42 días tuvieron una notable pérdida de células caliciformes, 95.5%, 65.5% y 86.8% respectivamente con respecto al control. El grupo E171 y CCR tuvieron una significativa disminución de células caliciformes respecto al control a los 72 días, ya que, tuvieron una pérdida del 67.8% y 41.8% respectivamente (Fig. 28 y 29).

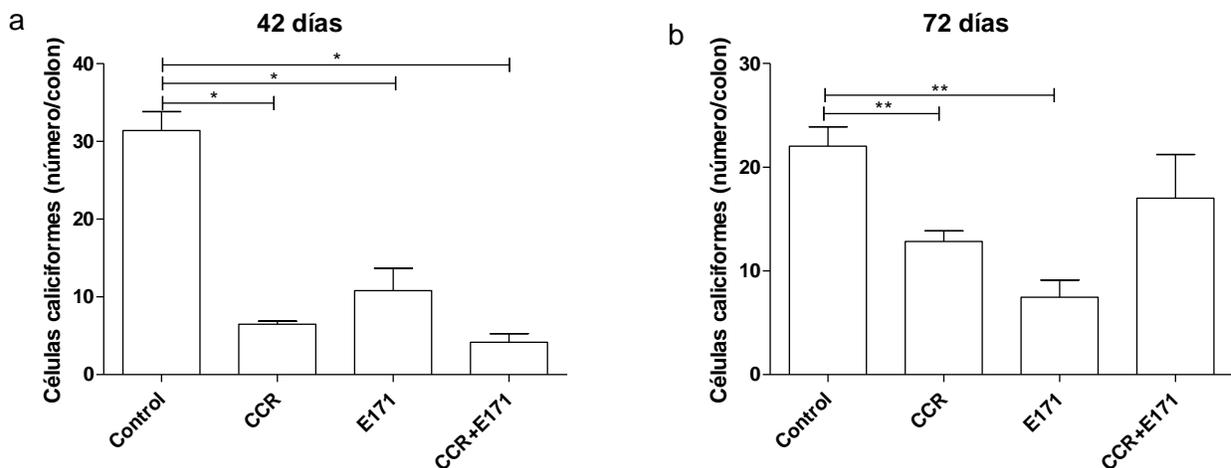


Figura 28. Número de células caliciformes en cortes histológicos de colon. En a) se puede observar que el número de células caliciformes en los grupos CCR, E171 Y CCR+E171 es significativamente más bajo que el control a los 42 días. En b) vemos como a los 72 días el número de células caliciformes desciende en el grupo CCR y E171 significativamente respecto al control. $P < 0.05\%$ Mann-Whitney.

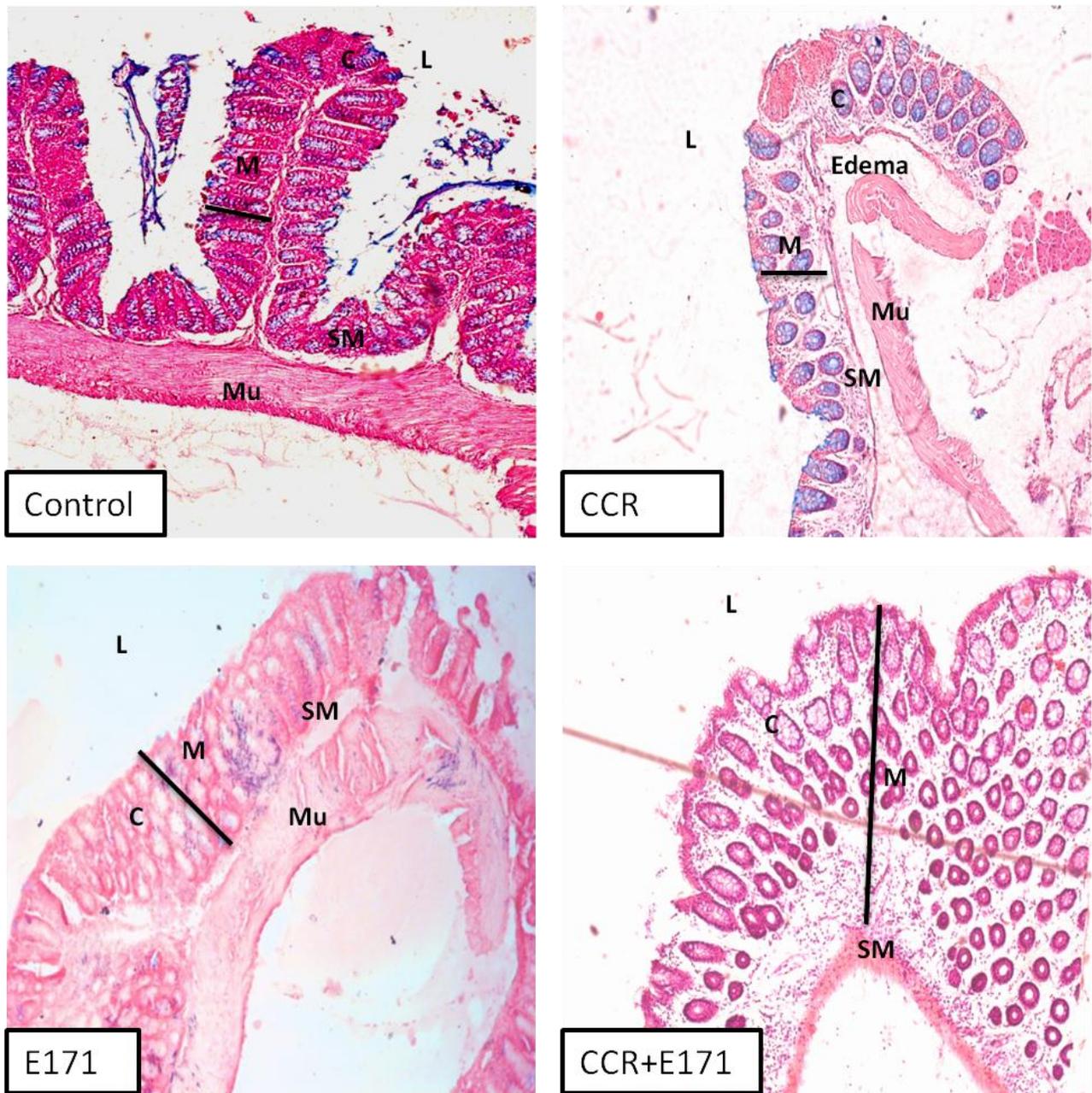


Figura 29. Tinción de Alcian Blue y Nuclear Red Fast donde las células caliciformes se tiñen de color azul. Se puede observar que en grupo E171 y CCR+E171 no hay tinción azul indicando la ausencia de células caliciformes. (M) mucosa, (Mu) muscular, (SM) submucosa, (C) cripta y (L) lumen.

7. Discusión

El estudio del efecto de la administración subcrónica intragástrica de las partículas E171 en la exacerbación de padecimientos previos en el tubo digestivo, tales como CU, SC o CCR es de gran importancia, ya que es un aditivo altamente usado en la industria de alimentos y las concentraciones con las que las normas permiten su uso no están delimitados en México. Además es importante la evaluación de alteraciones en otros órganos relacionados al sistema digestivo para analizar sus posibles consecuencias en ellos, ya que estos efectos no se conocen bien.

Para evaluar el daño hepático se miden los marcadores de daño en suero como los niveles totales de bilirrubina, la alanina aminotrasferasa y la asparto aminotrasferasa. Estudios previos han demostrado que hay daño hepático a dosis de 50 y 120 mg/kg de NPs de TiO₂ tras una exposición oral, debido a los mecanismos asociados a las especies reactivas de oxígeno (Zhang R. *et al.*, 2010; Ma L. *et al.*, 2009). Por lo anterior, se recomienda medir estos marcadores, ya que en las histologías solo se observa hiperplasia en las células de Kupffer en los grupos expuestos a las partículas E171. La hiperplasia se debe a la alta actividad de estos macrófagos que podrían estar fagocitando las partículas translocadas a este órgano (Abdelhalim M y Jarrar B., 2012).

Los cortes histológicos del riñón de los grupos no mostraron alteraciones estructurales. La exposición a nanopartículas causa congestión en los vasos sanguíneos como se ha visto en ratas expuestas a nanopartículas de oro (Abdelhalim M., 2012), esto puede causar atrofia renal que conlleva a la disfunción del órgano (Schrier R., 1999; Guzman P. *et al.*, 1994). La disfunción renal rutinariamente se evalúa mediante la medición de urea y creatinina plasmática. Desafortunadamente la creatinina es un indicador de función renal subóptimo, porque la creatinina plasmática está influenciada por eventos no renales que regulan la generación de creatinina, volumen de distribución y excreción de creatinina (Star R., 1998). La nefrotoxicidad es un efecto secundario de la exposición ambiental a las sustancias tóxicas y el epitelio del túbulo renal proximal es particularmente sensible a los efectos tóxicos de isquemia, de químicos y

medicamentos (Hewitt W. *et al.*, 1990; Muramatsu Y. *et al.*, 2002). Por lo tanto es importante medir marcadores adicionales de daño como la molécula de lesión renal-1 (KIM-1 por sus siglas en inglés), ya que es un biomarcador inducido por nefrotoxicidad. KIM-1 es una proteína transmembranal tubular, y su concentración en la orina proporciona una mejor predicción de lesiones histopatológicas que creatinina sérica o urinaria y es más sensible a grados bajos de toxicidad renal y muestra altos niveles de correlación entre los niveles de KIM-1 y los diferentes grados de histopatología renal (Waring W. y Moonie A., 2011; Vaidya V. *et al.*, 2010).

Una probable causa de la pérdida de la masa renal observada en este estudio es la estenosis renal. La estenosis de la arteria renal consiste en un estrechamiento de la arteria que lleva la sangre al riñón. Por lo tanto, esto afecta la llegada de oxígeno y de sangre que debe filtrarse en los glomérulos (Schreibe M. *et al.*, 1989). Por lo que la pérdida de masa de riñón en el grupo CCR+E171 podría deberse a estenosis que pudo darse por la congestión de los vasos renales debido a las partículas E171 que se componen en un 36% de NPs de TiO₂ y como se mencionó las nanopartícula pueden causar congestión de vasos sanguíneos (Abdelhalim M., 2012).

El peso que fue mayor en colon a los 72 días en el grupo CCR en comparación al control podría deberse a que hay más masa en el colon del grupo CCR debido a los tumores y procesos de proliferación celular que se da por la carcinogénesis (Tanaka T., 2009).

En algunos estudios se han visto altos niveles de IL-6 en el modelo murino de CCR con AOM/DSS además que si se bloquea su expresión se previene la inducción de tumores (Onizawa M. *et al.*, 2009; Kraus S. y Arber N., 2009). Por otra parte a lo descrito en otro estudio (Lee y Kim., 2011) IL-10 se reporta en altos niveles en CCR aquí la encontramos disminuida en los grupos CCR y CCR+E171. En ambos casos esto puede deberse al tiempo en que se midió su expresión, ya que los altos niveles se encuentran en etapas tempranas de desarrollo de CCR (Hara R. *et al.*, 1998). En contraste con TNF- α que no tuvo cambios, esto corresponde a lo hallado por Arianova y colaboradores que al administrar intragastricamente NPs de TiO₂, encuentran que no

hay cambios en los niveles de producción de las citocinas IL-6, IL-10 y TNF- α (Arianova E. *et al.*, 2012).

La medición de la concentración de las citocinas en el tejido colónico no indica un perfil inflamatorio ya que las citocinas pro-inflamatorias INF- γ , TNF- α e IL-1b tienen una baja concentración comparado al control, al igual que la citocina anti-inflamatoria IL-10.

Las alteraciones en las células de Kupffer en el hígado y las alteraciones en riñón se puede deber a la translocación de las partículas administradas oralmente (Jani P. *et al.*, 1994). Muchas partículas quedan retenidas en la mucosa y tejido colónico y muy pocas pasan a torrente sanguíneo y así a otros órganos posteriormente. Esto corresponde a lo reportado por Wang y colaboradores donde al medir el contenido de titanio en hígado, bazo y riñón de rata no encontraron diferencias significativas en estos órganos, solo al aumentar la dosis a 200 mg/kg observaron diferencias significativas (Wang Y. *et al.*, 2012).

Los procesos inflamatorios crónicos y su severidad están relacionados al desarrollo de CCR (Grivennikov S., 2013), por lo tanto el grupo CCR+E171 tuvo más tumores probablemente a que el proceso inflamatorio al que estuvo sometido fue mayor por la exposición a las partículas E171 ya que las NPs de TiO₂ inducen la formación de especies reactivas de oxígeno y con ello un proceso inflamatorio (Allouni Z. *et al.*, 2012). El proceso inflamatorio, combinado con la genotoxicidad y mediadores proinflamatorios de las NPs de TiO₂, promueve una mayor proliferación celular la cual es la base de la carcinogénesis (Trouiller B. *et al.*, 2009). Esto concuerda con los resultados de Sycheva y colaboradores que al exponer ratones a partículas de 33 y 160 nm de TiO₂ incrementa la tasa de proliferación del epitelio del colon (Sycheva L. *et al.*, 2011).

En los cortes de colon teñidos con H&E en los grupos CCR y CCR+E171 se ven células hipercromáticas que han incrementado su radio citoplasmático con una distorsión clara en su arquitectura ya que están formando un adenocarcinoma polipoide

parecidos a los descritos por Alrawi y colaboradores (Alrawi S. *et al.*, 2006). Además de que hay una pérdida de células caliciformes que es similar a lo reportado por Ochai y colaboradores (Ochai M. *et al.*, 2005). Por lo tanto en los grupos CCR y CCR+E171 encontramos microadenomas como los reportados por Jen y colaboradores que dan lugar al desarrollo de CCR (Jen J. *et al.*, 1994)

Con la tinción Alcian Blue se observa la pérdida de células caliciformes en los grupos E171 y CCR+E171 y esto es característico de una cripta fósica displásica, ya que se ve disminuida la producción de mucina por la pérdida de estas células como reporta Fenoglio y colaboradores en 1981 (Fenoglio C. *et al.*, 1981). Las criptas empobrecidas de mucina son también considerados microadenomas y son lesiones que en pacientes presentan grandes riesgos de desarrollar CCR como reporta Femia y colaboradores (Femia A. *et al.*, 2008 y Ochai M. *et al.*, 2005). Estas lesiones generalmente se producen en la parte distal del colon y con el tiempo van creciendo y promueven la formación de tumores (Femia A. *et al.* 2004). Por lo tanto son importantes estas lesiones ya que realmente se pueden considerar como lesiones pre malignas para desarrollar CCR (Femia A. y Caderni G., 2008).

Son importantes los estudios de la exposición crónica o subcrónica a las partículas E171 debido a que por las diferentes alteraciones que causan representan un problema a la salud pública. Las normas mexicanas que controlan el uso de este aditivo no establecen un rango límite de uso. Por esto es de gran importancia seguir con estos estudios para establecer límites en el uso de este aditivo que actualmente se agrega el mínimo necesario para obtener las características deseadas en el producto

8. Conclusiones

El número de tumores fue mayor en el grupo CCR+E171 en comparación con el grupo CCR, ya que hubo 4 veces más este grupo. El grupo E171 no presentó tumores. Por ende, la exposición intragástrica a E171 durante 72 días exacerba el número de tumores en el modelo murino de CCR, mientras que el número de células caliciformes

del colon disminuyó en el grupo E171 a los 42 días y 72 días respecto al control. Por lo tanto la exposición intragástrica a E171 durante 42 y 72 días produce criptas empobrecidas en mucina ya que pierde células caliciformes. Este tipo de criptas se consideran lesiones pre carcinogénicas.

El riñón a los 72 días tuvo disminución en el peso, pero al ser medidas las concentraciones de urea y creatinina no mostraron alteraciones, por lo tanto se sugiere medir los niveles de KIM-1 como marcador de daño renal por ser un más sensible y se puede detectar a etapas muy tempranas de daño renal.

Se encontraron alteraciones histológicas en el hígado de los grupos tratados con E171. En estos grupos se observa hiperplasia de las células Kupffer, esto puede deberse a la translocación de las partículas que componen al E171.

Por lo tanto la exposición subcrónica a E171 vía intragástrica exagera el número de tumores un modelo murino de cáncer colorrectal.

9. Referencias

- Abdelhalim M y Jarrar B. 2012. Histological alterations in the liver of rats induced by different gold nanoparticle sizes, doses and exposure duration. *Journal of nanobiotechnology*. doi: 10.1186/1477-3155-10-5.
- Allouni Z., HøI P., Cauqui M., Gjerdet N. y Cimpan M. 2012. Role of physicochemical characteristics in the uptake of TiO₂ nanoparticles by fibroblasts. *Toxicology In Vitro*. Vol. 26. 469-79 pp.
- American Cancer Society. 2009. *Cancer facts and figures 2009*. Atlanta:American Cancer Society.
- Becker K., Schroecksnadel S., Geisler S., Carriere M., Gostner J., Schennach H., Herlin N. y Fuchs D. 2014. TiO₂ nanoparticles and bulk material stimulate human peripheral blood mononuclear cells. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 65. 63-69 pp.
- Current Intelligence Bulletin 63, CDC, 2014. disponible en: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/pdfs/2011-160.pdf>
- Arthur J. y Jobin C. 2011. The Struggle Within: Microbial Influences on Colorectal Cancer. *Inflammatory Bowel Disease*. Vol. 17. 396-409 pp.
- Barbosa A., Valim L., Lamas G., Silva F., Almeida C., Salma F., Lima H y Borges M. 2012. *Multivariate Analysis in Advanced Oxidation Process. Multivariate Analysis in Management, Engineering and the Sciences*.
- Bird P. 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Letter*. Vol. 37. 147-151 pp.

- Bergin I. y Witzmann F. 2013. Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. *International journal of biomedical nanoscience and nanotechnology*. Vol. 3. DOI: 10.1504/IJBNN.2013.054515.
- Boyle T., Fritschi L., Heyworth J. y Bull F. 2011 Long-term sedentary work and the risk of subsite-specific colorectal cancer. *American Journal of Epidemiology*. Vol. 173.1183-1191 pp.
- Castillejo A., Vargas G., Castillejo M., Navarro M., Barbera V., González S., Eva Hernández-Illán., Brunet J., Ramón T., Balmaña J., Oltra S., Iglesias S., Velasco A., Solanes A., Campos O., Sánchez A., Gallego J., Carrasco E., González D., Segura A., Chirivella S., Juan M., Tena S., Lázaro C., Blanco I., Pineda M., Capellá C. y Soto J. 2014. Prevalence of germline MUTYH mutations among Lynch-like syndrome patients. *European Journal of Cancer*.
- Center M., Jemal A. y Ward E. 2009. International Trends in Colorectal Cancer Incidence Rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*. Vol. 18. 1688-1699 pp.
- Chan A. y Giovannucci E. 2010. Primary Prevention of Colorectal Cancer.
- Chae H. y Jeon C. 2014. Peutz-Jeghers syndrome with germline mutation of STK11. *Annals of surgical treatment and research*. Vol. 86. 325-330 pp.
- Chen J. y Huang X. 2009. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biology & Therapy*. Vol. 8.1313-1317 pp.
- Clapper M., Cooper H. y Chang W. 2007. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacologica Sinica*. Vol. 28. 1450-1459 pp.

Cui Y, Liu H, Zhou M, Duan Y, Li N, Gong X, Hu R, Hong M, Hong F. 2010. Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO₂ nanoparticles. Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Disponible en: American Cancer Society 2013.
<http://www.cancer.org/espanol/cancer/colonyrecto/recursosadicionales/fragmentado/deteccion-temprana-del-cancer-colorrectal-risk-factors-for-c-r-c>. 2014

Disponible en: European Commission Recommendation on the definition of nanomaterial. <http://osha.europa.eu/en/news/eu-european-commissionrecommendation-on-the-definition-of-nanomaterial>. 2014

Disponible en <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/additives.htm>. 15/08/2013.

Disponible en Diario Oficial de la Federación: www.dof.gob.mx

Disponible en: GLOBOCAN, 2012.
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx 28/Febrero/2014. 2014.

Durko L. y Malecka-Panas E. 2014. Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer. Current Colorectal Cancer Reports. Vol. 10. 45-54 pp.

Faust J., Doudrick K., Yang Y., Westerhoff P. y Capco D. 2014. Food grade titanium dioxide disrupts intestinal brush border microvilli in vitro independent of sedimentation. Cell biology and toxicology. Vol. 30. 169-188 pp.

Femia A. y Caderni G. 2008. Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. Planta Medica. Vol. 74. 1602-1607 pp.

- Femia A., Dolara P. y Caderni G. 2004. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. Vol. 25. 277-281 pp.
- Femia A., Giannini A., Fazi M., Tarquini E., Salvadori M., Roncucci L. , Tonelli F., Dolara P. y Caderni G. 2008. Identification of Mucin Depleted Foci in the Human Colon. *Cancer Prevention Research*. Vol. 1. 562-567 pp.
- Fenoglio C., Haggitt R., Hamilton S., Lumb G., Pascal R. y Riddell R. 1981. Colonic dysplasia. Vol. 16. 181-213 pp.
- Gilsing A., Fransen F., de Kok T., Goldbohm A., Schouten L., de Bruïne A., van Engeland M., van den Brandt P., de Goeij A. y Weijnenberg M. 2013. Dietary heme iron and the risk of colorectal cancer with specific mutations in KRAS and APC. *Carcinogenesis*. Vol. 34. 2757-2766 pp.
- Grivennikov S. 2013. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Seminars in Immunopathology*. Vol. 35. 229-244 pp.
- Giovannucci E. 2001. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *The Journal of Nutrition*. Vol. 131. 3109-3120 pp.
- Gui S., Zhang Z, Zheng L, Cui Y, Liu X, Li N, Sang X, Sun Q, Gao G, Cheng Z, Cheng J, Wang L, Tang M, Hong F. 2011. Molecular mechanism of kidney injury of mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*. Vol 195. 365-370 pp.
- Gui S., Sang X., Zheng L., Ze Y., Zhao X., Sheng L., Sun Q., Cheng Z., Cheng J., Hu R., Wang L., Hong F. y Tang M. 2013. Intra-gastric exposure to titanium dioxide nanoparticles induced nephrotoxicity in mice, assessed by physiological and gene expression modifications. *Particle and Fibre Toxicology*. Vol. 10. 2-16 pp.

- Guzman P., Zierler R., Isaacson A., Bergelin O. y Strandness E. 1994. Renal atrophy and arterial stenosis. A prospective study with duplex ultrasound. *Hypertension*. Vol. 23. 346-350 pp.
- Half E., Bercovich D. y Rozen P. 2009. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. Vol. 4. 1-23 pp.
- Han H. y Ba R. 2009. Buoyant photocatalyst with greatly enhanced visible-light activity prepared through a low temperature hydrothermal method. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. Vol. 48. 2891-2898 pp.
- Hara R., Greenman J, MacDonald A., Gaskell K., Topping K., Duthie G., Kerin M., Lee P. y Monson J. 1998. Advanced colorectal cancer is associated with impaired interleukin 12 and enhanced interleukin 10 production. *Clinical Cancer Research*. Vol. 4. 1943-1948 pp.
- Hebels D. 2010. Toxicogenomic responses to N-nitroso compound exposure in relation to human colorectal cancer risk. Nederland, Maastricht. University of Maastricht.
- Hewitt W., Goldstein R. y Hook J. 1990. Toxic responses of the kidney. In: Casarett and Doull's Toxicology, edited by Klassen CD, Doull J, and Amdur MO. New York. 354-382 pp.
- IARC Monograph. 2010. World health organization international agency for research on cancer. Vol. 93.
- International Agency For Research On Cancer. 2009. IARC Strengthens its findings on several carcinogenic personal habits and household exposures. Press Release N° 196.

- Jani P., Halbert G., Langridge J. y Florence T. 1990. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. Vol. 42. 821-826 pp.
- Jemal A., Bray. F., Center M., Ferlay J., Ward E. y Forman D. 2011. Global Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*. Vol. 61. 69–90 pp.
- Jen J., Powell S., Papadopoulos N., Smith K., Hamilton S., Vogelstein B. y Kinzler K. 1994. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Research*. Vol. 54. 5523-5526 pp.
- Key T., Schatzkin A., Willett W., Allen N., Spencer E. y Travis R. 2004. Diet, nutrition and the prevention of cáncer. *Public Health Nutrition*. Vol. 7. 187–200 pp.
- Kim E., Coelho D y Blachier F. 2013. Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutrition Research*. Vol. 33. 983–994 pp.
- Kraus S y Arber N. 2009. Inflammation and colorectal cancer. *Current Opinion in Pharmacology*. Vol. 9. 405-410 pp.
- Lahoz M., Martínez J., Laguía M., Valero J. y Galve A. 2000. Gardner's syndrome. *ORL Aragón*. Vol. 3. 13-14 pp.
- Lakatos P. y Lakatos L. 2008. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: Changes, causes and management strategies. *World Journal of Gastroenterology*. Vol. 14. 3937-3947 pp.
- Lee S. y Kim M. 2011. Cytokines in Cancer Immunotherapy. www.mdpi.com/journal/cancers

- Li N, Duan Y, Hong M, Zheng L, Fei M, Zhao X, Wang J, Cui Y, Liu H, Cai J, Gong S, Wang H, Hong F. 2010. Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Letters*. Vol 195. 161-168 pp.
- Ma L., Zhao J., Wang J., Liu J., Duan Y., Liu H., Li N., Yan J., Ruan J., Wang H. y Hong F. 2009. The Acute Liver Injury in Mice Caused by Nano Anatase TiO₂. *Nanoscale Research Letters* Vol. 4. 1275-1285 pp.
- Marrero J., Matkowskyj K., Yung K., Hecht G. Y Benya R. 2000. Dextran sulfate sodium-induced murine colitis activates NF- κ B and increases galanin-1 receptor expression. *American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. Vol. 278. 797-804 pp.
- Matsumoto H., Takata R. y Komeiji D. 1979. Synthesis of the Glucuronic Acid Conjugate of Methylazoxymethanol. *Cancer Research*. Vol. 39. 3070-3073 pp.
- Muramatsu Y., Tsujie M, Kohda Y, Pham B, Perantoni AO, Zhao H, Jo SK, Yuen PS, Craig L, Hu X, and Star RA. 2002. Early detection of F562 cysteine rich protein 61 (CYR61, CCN1) in urine following renal ischemic reperfusion injury. *Kidney International*. Vol. 62. 1601-1610 pp.
- McLellan E. y Bird R. 1988. Aberrant Crypts: Potential Preneoplastic Lesions in the Murine Colon. *Cancer Research*. Vol. 48. 6187-6192.
- Meira L., Bugni J., Green S., Lee C., Pang B., Borenshtein D., Rickman B., Rogers A., Moroski-Erkul C., McFaline J., Schauer D., Dedon P., Fox. y Samson L. 2008. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 118. 2516-2525 pp.
- Morgan G., Silva A. y Sat D. 2008. Colorectal risk factors. *Gaceta Mexicana de Oncología*. Vol. 7. 12-15 pp.

- Ni J., Chen S. y Hollander D. 1996. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut*. Vol. 39. 234-241 pp.
- Neufert C., Becker C. y Neurath M. 2007. An Inducible Mouse Model Of Colon Carcinogenesis For The Analysis Of Sporadic And Inflammation-Driven Tumor Progression. Nature Publishing Group. Vol. 2. 1998-2004 pp.
- Ochiai M., Watanabe M., Nakanishi M., Taguchi A., Sugimura T. y Nakagama H. 2005. Differential staining of dysplastic aberrant crypt foci in the colon facilitates prediction of carcinogenic potentials of chemicals in rats. *Cancer Letters*. Vol. 220. 67-74 pp.
- Onizawa M., Nagaishi T., Kanai T., K Nagano., Oshima S., Nemoto Y., Yoshioka A., Totsuka T., Okamoto R., Nakamura T., Sakamoto N., Tsuchiya K., Aoki K., Ohya K., Yagita H. y Watanabe M. 2009. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. Vol. 296. 850-859 pp.
- Ozerov S., Zakharov I., Talygov S., Konovalov D., Kislyakov A., Kachanov D., Zheludkova O., Varfolomeeva S. Y Rachkov V. Turcot Syndrome. 2013. A rare case and literature review. *Practical Notes*. Vol. 77. 49-53 pp.
- Pericleous M., Mandair D. y Caplin M. 2013. Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. *The Journal of Gastrointestinal Oncology*. Vol. 4. 409-423 pp.
- Perse M. y Cerar A. 2012. Dextran Sodium Sulphate Colitis MouseModel: Traps and Tricks. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Vol. 2012. 2-13 pp.
- Peters R., van Bommel G., Herrera-Rivera Z., Helsper J., Marvin H., Weigel S., Tromp P., Oomen A., Rietveld A. y Bouwmeester H. 2014. Characterisation of titanium dioxide nanoparticles in food products: Analytical methods to define nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chremestry*. Publication Date (Web).

- Ross M. H. y Pawlina W. 2006. Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. Buenos Aires, Argentina. Editorial Medica Panamericana.
- Saika E., Morioka T., Yamada E., Ohkubo H., Higurashi T., Hosono K., Endo H., Takahashi H., Takamatsu R., Cui C., Shiozawa M., Akaike M., Samura H., Nishimaki T., Nakajima A. y Yoshimi N. Identification of preneoplastic lesions as mucin-depleted foci in patients with sporadic colorectal cancer. *Cancer Science*. Vol. 103. 144-149 pp.
- Sardo C., Hibler E., Ashbeck E., Thomson C., Garcia D., Roe D., Harris R., Lance R., Cisneroz M., Martinez M., Thompson P. y Jacobs E. 2014. Sedentary behavior is associated with colorectal adenoma recurrence in men. *Cancer Causes Control*. Epub ahead of print.
- Schins R. y Knaapen A. 2007. Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhalation toxicology*. Vol. 19. 189-198 pp.
- Schrier R. 1999. Atlas of diseases of the kidney. Denver, Colorado. University of Colorado School of Medicine.
- Schreiber M., Pohl M. y Novick A. 1989. The natural history of atherosclerotic and fibrous renal artery disease. *The Urologic clinics of North America*. Vol. 11. 383-392 pp.
- Singh K., Singh A., Kumar P. y Gupta N. 2014. Prosthodontic management of a patient with Gardner's syndrome: A clinical case report. *Dental research journal*. Vol. 11. 276-80 pp.
- Star R. 1998. Treatment of acute renal failure. *Kidney International*. Vol. 54. 1817-1831 pp.

- Sycheva L., Zhurkov V., Iurchenko VV., Daugel-Dauge N., Kovalenko M., Krivtsova E. y Durnev A. 2011. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo. *Mutation Research*. Vol. 27. 8-14 pp.
- Systemic Absorption of Nanomaterials by Oral Exposure. 2013. Danish Ministry of the Environment.
- Sycheva. L.P., Zhurkov. V.S., Iurchenko. V.V., Daugel-Dauge. N.O., Kovalenko. M.A., Krivtsova. E.K. y Durnev. A.D. 2011. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo. *Mutation Research*. Vol 726. 8–14 pp
- Solomon L., Mansor S., Mallon P., Donnelly E., Hoper M., Loughrey M., Kirk S. y Gardiner K. 2010. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comparative Clinical Pathology*. Vol. 19. 235-239 pp.
- Soon S., Emerich S., Requeijo S., Weisburger J. y Gonzalez F. 2001. Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. *Cancer Research*. Vol. 61. 8435-8440 pp.
- Stevens R., Swede H. y Rosenberg D. 2007. Epidemiology of colonic aberrant crypt foci: Review and analysis of existing studies. *Cancer Letters*. Vol. 252. 171-183 pp.
- Tanaka T. 2009. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal Carcinogenesis*. Vol 8.
- Tanaka T. 2012. Development of an inflammation-associated colorectal cancer model and its application for research on carcinogenesis and chemoprevention. *International Journal of Inflammation*. Vol. 2012. 1-16 pp.

- Thomson R. y Shaffer E. 2005. First Principles of Gastroenterology. Toronto, Canada. Janssen-Ortho.
- Trouiller B., Reliene R., Westbrook A., Solaimani P. y Schiestl R. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. 2009. Cancer Research. Vol.15.8784-9 pp.
- Vaidya V., Ozer J., Frank D., Collings F., Ramirez V., Troth S., Muniappa N., Thudium D., Gerhold D., Holder D., Bobadilla N., Marrer E., Perentes E., Cordier A., Vonderscher J., Maurer G., Goering P., Sistare F. y Bonventre J. 2010. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in multi-site preclinical biomarker qualification studies. Nature biotechnology. Vol. 28. 478-485 pp.
- Vallejo D., Garnica D., Bonilla R. y Olaya N. 2012. First Case Report of Turcot Syndrome Type 1 in Colombia. Case Reports in Oncological Medicine. Vol.2012. 1-4 pp.
- Vasen H., Hendriks Y., De Jong A., Van Puijenbroek M., Tops C., Bröcker-Vriends A., Wijnen J. y Morreau H. 2004. Identification of HNPCC by molecular analysis of colorectal and endometrial tumors. Disease Markers. Vol. 20. 207-213 pp.
- Waring W. y Moonie A. 2011. Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury. Clinical Toxicology Vol.49. 720-728 pp.
- Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z. 2007. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. Toxicology Letters. Vol. 168. 176-185 pp.
- Wang Y., Chen Z., Ba T., Pu J., Chen T., Song Y., Gu Y., Qian Q., Xu Y., Xiang K., Wang H. y Jia G. 2012. Susceptibility of Young and Adult Rats to the Oral Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles. Samll. Vol. 9. 1742-1752 pp.

- Weir A. Westerhoff P. Fabricius L. y Von Goetz N. 2012. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental Science y Technology*. Vol. 46. 2242-2250 pp.
- Yamada Y., Yoshimi N., Hirose Y., Kawabata K., Matsunaga K., Shimizu M., Hara A y Mori H. 2000. Frequent β -Catenin Gene Mutations and Accumulations of the Protein in the Putative Preneoplastic Lesions Lacking Macroscopic Aberrant Crypt Foci Appearance, in Rat Colon Carcinogenesis. *Cancer Research*. Vol. 60. 3323-3327 pp.
- Yen T-H. y Wright N. 2006. The gastrointestinal tract stem cell niche. *Stem Cell Reviews*. Vol. 2. 203-212 pp.
- Zhanga R., Niu Y., Li Y., Zhaoc C., Songa B., Li Y. y Zhou Y. 2010. Acute toxicity study of the interaction between titanium dioxide nanoparticles and lead acetate in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Vol. 30. 52-60 pp.
- Zhao J., Li N., Wang S., Zhao X., Wang J., Yan J., Ruan J., Wang H. y Hong F. 2014. The mechanism of oxidative damage in the nephrotoxicity of mice caused by nano-anatase TiO₂. *Journal of Experimental Nanoscience*. Vol. 5. 447-462 pp.