



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA (FESI.)

TOXICOLOGÍA

**INESTABILIDAD GENÓMICA POR EXPOSICIÓN A
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO EN UN MODELO DE
CÁNCER DE COLON**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Biol. ISMAEL MANUEL URRUTIA ORTEGA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA (FESI.)

COMITÉ TUTOR: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (IIB.)
DR. JESUS AGUIRRE LINARES.
INSTITUTO DE FIOLOGÍA CELULAR (IFC.)

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México Octubre del 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen.....	4
1. Antecedentes.....	5
1.1 El cáncer.....	5
1.2 Cáncer colorectal (CCR).....	7
1.3 Factores de riesgo para el CCR	10
1.3.1 Estilo de vida.....	10
1.3.2 Enfermedades inflamatorias del intestino y flora bacteriana.....	13
1.3.3 Ambiente luminal del intestino.....	14
1.4 causas moleculares del CCR.....	15
1.4.1 Inestabilidad genómica.....	15
1.4.2 Inestabilidad cromosómica (INC).....	17
1.4.3 Inestabilidad de microsatélites (IMS).....	21
1.4.4 Fenotipo de cáncer colorectal por metilación de islas CpG (CIMP).....	22
1.5 Nanopartículas de dióxido de titanio (NP-TiO ₂) grado alimenticio (E171).....	25
1.5.1 Efecto de la exposición a E171 en colon de ratones.....	26
1.5.2 Evidencia de genotoxicidad por exposición a NPs-TiO ₂	28
1.5.3 NPs-TiO ₂ como posibles causantes de INC.....	28
1.5.4 Evidencia de que las NPs-TiO ₂ dañan la estructura de microtúbulos (Mts).....	29
1.6 Modelo animal de CCR con ratones BALB/c, azoximetano y dextrán sulfato de sodio (AOM/DSS).....	29
2. Pregunta experimental.....	31
3. Hipótesis.....	31
4. Objetivos.....	31
4.1 Objetivos específicos.....	31
4.1.1 modelo in vivo.....	31
4.1.2 modelo in vitro.....	32
5. Estrategia experimental.....	32
5.1 Análisis de las partículas.....	32
5.2 Inducción de CCR en ratones y administración de E171.....	33
5.3 Histología de colon.....	34
5.4 cultivo primario de colonocitos.....	34
5.5 Análisis de progresión tumoral.....	34
5.6 Cuantificación de células caliciformes.....	35
5.7 Detección de interleucinas (ILs) IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-10 and GM-CSF en tejido de colon.....	35
5.8 Análisis estadístico.....	35
5.9 Cultivo de células HCT116.....	36
5.10 Tinción de células HCT116 con H&E.....	36
5.11 Viabilidad de células HCT116.....	36
5.12 Técnica de micronúcleos (MNs).....	36
5.13 Interacción de E171 con husos mitóticos de células HCT116.....	37
6. Resultados.....	37
6.1 Caracterización de las partículas E171.....	37
6.2 Consumo de agua y alimento.....	40

6.3 inducción de secreción perianal por exposición a AOM/DSS y E171.....	42
6.4 Número de tumores en colon.....	43
6.5 Determinación histológica de progresión tumoral por exposición intragástrica a E171.....	44
6.6 Evaluación del grado de progresión tumoral mediante los marcadores: Ki67, COX2 y β - catenina.....	45
6.7 Disminución de células caliciformes en el colon.....	51
6.8 Determinación de interleucinas en tejido colorectal.....	52
6.9 La exposición intragástrica a E171 alteró el peso de los riñones de los ratones.....	53
6.10 El cultivo primario internalizó las partículas de E171.....	54
6.11 Las partículas de E171 fueron internalizadas por células HCT116.....	56
6.12 Las partículas de E171 no alteran la viabilidad de células HCT116.....	57
6.13 Las partículas de E171 promueven la pérdida de material genómico.....	58
6.14 Las partículas de E171 se acumulan principalmente en los polos del huso mitótico.....	59
7. Discusión.....	61
7.1 Análisis del modelo murino y desarrollo de tumores.....	61
7.2 análisis histológico de los tumores.....	62
7.3 Análisis sobre la expresión de β -catenina y su problema participación en la vía Wnt.....	64
7.4 Análisis del papel de COX2 en el desarrollo de los tumores.....	65
7.5 Análisis del papel de Ki67 en el desarrollo de los tumores.....	66
7.6 Análisis del papel de las interleucinas en el desarrollo de los tumores.....	67
7.7 Análisis del posible mecanismo de inestabilidad genómica.....	67
8. conclusiones.....	68
8.1 Conclusión general.....	70
9. Referencias	71
Agradecimientos	

Resumen

El cáncer colorectal (CCR) es el cuarto tipo de cáncer más diagnosticado en el mundo. Los principales factores de riesgo para desarrollar esta enfermedad es baja actividad física, tabaquismo, alcoholismo y la dieta que incluye el consumo de carne roja y el bajo consumo de fibra. Otros compuestos encontrados en la dieta han sido poco estudiados, como es el caso de los nanomateriales que se utilizan como aditivos en los alimentos; ejemplo de esto el dióxido de titanio (TiO_2) grado alimenticio (E171), mismo que se ha clasificado como posible carcinógeno para el humano según la agencia internacional para la investigación en cáncer (siglas en inglés IARC). El presente trabajo tiene como hipótesis que la ingesta oral de TiO_2 en su forma utilizada como aditivo, podría desencadenar o potenciar la formación de tumores en el colon. En el presente trabajo utilizamos un modelo in vivo de ratones BALB/c a los que se les indujo mediante la exposición a azoximetano/dextrán de sulfato de sodio (AOM/DSS) la formación de CCR. Los ratones fueron expuestos de la siguiente manera: a) control (Ct), b) E171, c) CCR d) CCR+E171. Nuestros resultados muestran que las partículas de E171 contienen una fracción de nanopartículas dispersas en agua que alcanzan un tamaño de 100 nm. La administración intragástrica de E171 (5mg/kg/5 días/10 semanas) no indujo la aparición de tumores por si solo pero indujo alteraciones displásicas e incremento en la expresión de marcadores tumorales Ki-67, COX2 y β -catenina en el colon. Algunas partículas se internalizaron en células colónicas de los grupos E171 y CCR+E171, mismos grupos que presentaron disminución en el número de células caliciformes. En el modelo In vitro: Expusimos células HCT116 a 0, 5, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171 durante 24 h. Las células expuestas a E171 internalizaron las partículas, presentaron incremento de daño genotóxico por el incremento de micronúcleos (MNs) y se unieron al uso mltótico de células en mitosis. En conclusión: Las partículas de E171 potenciaron la aparición de tumores en el colon y generaron daños genotóxicos asociados a alteraciones en los microtubulos.

1. Antecedentes

1.1 El cáncer

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades con características comunes. Las características que comparten estas enfermedades son 1) la proliferación celular descontrolada en los tejidos, 2) la evasión de muerte celular por apoptosis, 3) presentan metástasis e invasión a otros tejidos, 4) también muestran angiogénesis, 5) así como la activación sostenida de vías de señalización de factores de crecimiento, 6) son insensibles a las señales de inhibición del crecimiento que son reguladas por el sistema inmune (Hanahan D y Weinberg RA. 2011).

Cuando el cáncer se desarrolla, las células, alteran su ciclo de vida y se dividen en lugar de morir, de esta manera surgen células que no son necesarias para los tejidos, lo que da lugar a la formación de tumores. Las células cancerosas pueden formar tumores sólidos o bien no hacerlo como los que se originan en la sangre.. Hay dos tipos de tumores, los que se consideran malignos y los que no lo son. Los tumores no malignos (adenomas) generalmente no son invasivos por lo que no se expanden en tejidos cercanos, usualmente cuando son extirpados de la zona de crecimiento, no vuelven a crecer por lo que la enfermedad se detiene, aunque se debe considerar que si estos no se remueven a tiempo pueden dar lugar a un tumor maligno (Fig. 1). Por su parte los tumores malignos (carcinomas) generalmente ya han invadido de la zona epitelial a la zona endotelial del tejido y tienen la capacidad para invadir otros tejidos (Cancer Institute. 2015, <http://www.cancer.gov/>).

La carcinogénesis

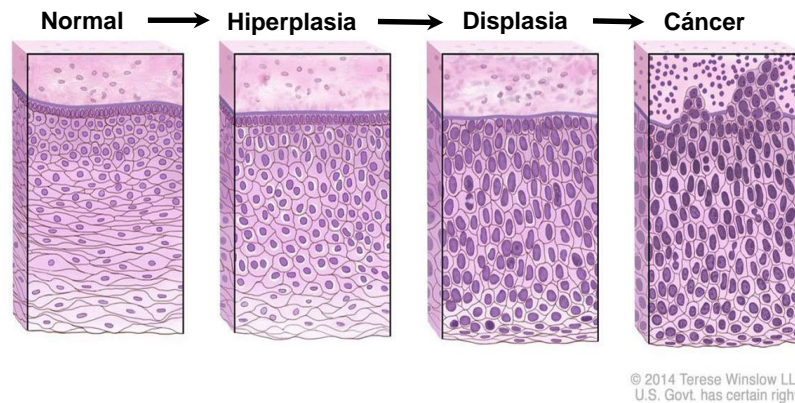


Fig. 1. **Carcinogénesis de un epitelio normal.** Un epitelio normal sufre diferentes cambios morfológicos cuando sufre carcinogénesis, en primer lugar sufre hiperplasia que es un aumento anormal de tamaño que sufre un órgano o un tejido orgánico debido al incremento del número de células normales que lo forman. Posteriormente una displasia que es una anomalía en el desarrollo de un tejido, de un órgano o de una parte anatómica del organismo. Por último se forma un tumor maligno.
<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>

El cáncer es una enfermedad genética en la cual el material genético de las células sufre alteraciones lo que les confiere nuevas capacidades principalmente en la proliferación y crecimiento. Estas alteraciones son inducidas por agentes externos que generalmente son sustancias provenientes del ambiente, por lo que cada persona estará sujeta a cambios genéticos específicos. Algunos ejemplos de agentes externos que generan mutaciones en el DNA son los químicos provenientes del tabaco y la luz ultravioleta derivada de los rayos solares. Los genes que sufren daño son aquellos que regulan la división y crecimiento celular, a estos se les ha denominado proto-oncogenes y genes supresores de tumor. Los proto-oncogenes regulan el crecimiento y división celular mientras que los genes supresores de tumor están encargados de regular el ciclo celular.

Existen más de 100 tipos de cáncer que son usualmente llamados según el órgano donde se hayan formado. También pueden definirse según el tipo de células donde aparezcan, en esa clasificación tenemos a los carcinomas que son los más comunes de todos y se originan en las células epiteliales, este se divide a su vez y recibe un nombre particular dependiendo de qué tipo de célula epitelial lo desarrolle, de ahí tenemos los siguientes tipos: 1) Adenocarcinoma que se desarrolla en células epiteliales que producen fluidos o moco, 2) carcinoma de células basales, que se origina en la base del tejido, 3) carcinoma de células escamosas, que se origina en las células escamosas que recubren a los tejidos y 4) carcinoma de células transicionales, que se origina en el denominado epitelio transicional o urotelio. Los sarcomas: son cánceres que se forman en la médula ósea y tejidos suaves como el músculo, vasos sanguíneos, vasos linfoides y tejido esponjoso como tendones y ligamentos, el más común de estos tipos de cáncer es el osteosarcoma que se origina en los huesos. La leucemia es el tipo de cáncer que se origina en el tejido que conforma a la sangre, no forma tumores sólidos, se clasifica a su vez dependiendo de la velocidad con la que se desarrolle. El linfoma es el tipo de cáncer que se origina en los linfocitos (células B o T) que son parte del tejido linfoide. El mieloma múltiple se origina en el plasma sanguíneo. El melanoma se origina en los melanocitos que se especializan en producir la melanina tanto en la piel como en los ojos. Los tumores de cerebro y medula espinal corticoide (sistema nervioso central) reciben el nombre de dependiendo del tipo de célula del sistema nervioso, el que se desarrolla, por ejemplo los astrocitomas que se pueden originar a partir de los astrocitos. (Cancer Institute. 2015, <http://www.cancer.gov/>).

1.2 Cáncer colorrectal (CCR)

El cáncer colorrectal es una enfermedad en la que las células anormales en el colon o en el recto se dividen sin control y terminan por formar un tumor maligno. El colon y el recto son partes del aparato digestivo, el cual absorbe los nutrientes de los alimentos y el agua y almacena el deshecho sólido hasta que sale del cuerpo (Fig.

2).

El colon

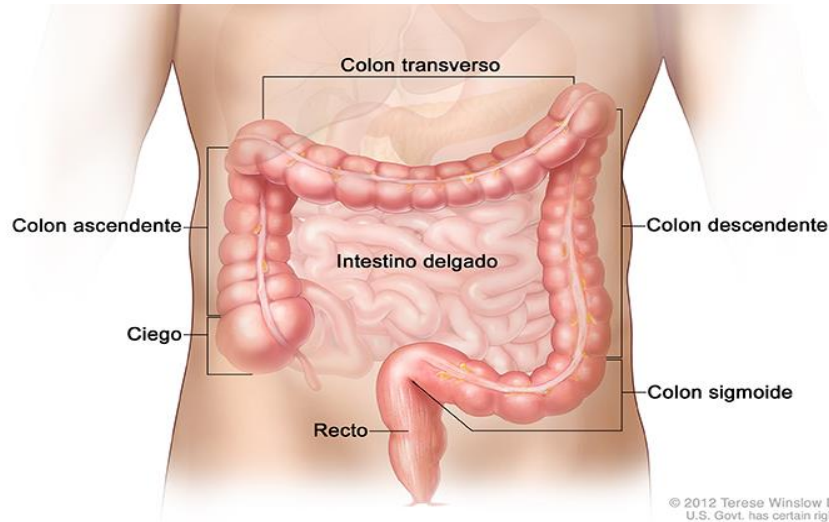


Fig. 2. Partes del colon. Ilustración del abdomen que muestra las cuatro secciones del colon: el colon ascendente, el colon transverso, el colon descendente y el colon sigmoide. También se observan el intestino delgado, el ciego y el recto. El ciego, el colon, el recto y el conducto anal forman el intestino grueso. El ciego, el colon ascendente y el colon transverso componen la parte superior o el colon proximal; el colon descendente y el colon sigmoide forman la parte inferior o el colon distal. <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal>

El cáncer colorectal (CCR) a nivel mundial es el tercer tipo de cáncer más diagnosticado en hombres y el segundo en mujeres. En 2012 se reportaron 1,360,602 casos de los cuales murieron 693,881, de esta forma se ubica en el tercer lugar de mortalidad a nivel mundial (GLOBOCAN., 2012). La mayoría de los casos ocurren entre los 60 y 70 años de edad, por lo que se ha asociado a la edad como un factor de riesgo de incidencia. A nivel mundial la tasa de incidencia incrementa

a 1 millón de nuevos casos cada año, pero en países desarrollados de Europa, Norte América y Oceanía la tasa incrementa hasta 25 veces (Fig. 3) (Boyle., 2008, ParKin., 2004). Los estudios epidemiológicos alrededor del mundo demuestran variación en la incidencia de este tipo de cáncer debido a la región geográfica y un incremento en el riesgo y mortalidad en ciudades afluentes de inmigración (REF). Datos prospectivos de diferentes cohortes alrededor del mundo han relacionado al CCR con hábitos alimenticios y estilo de vida (Bingham., 2005).

Incidencia mundial de cáncer colorectal

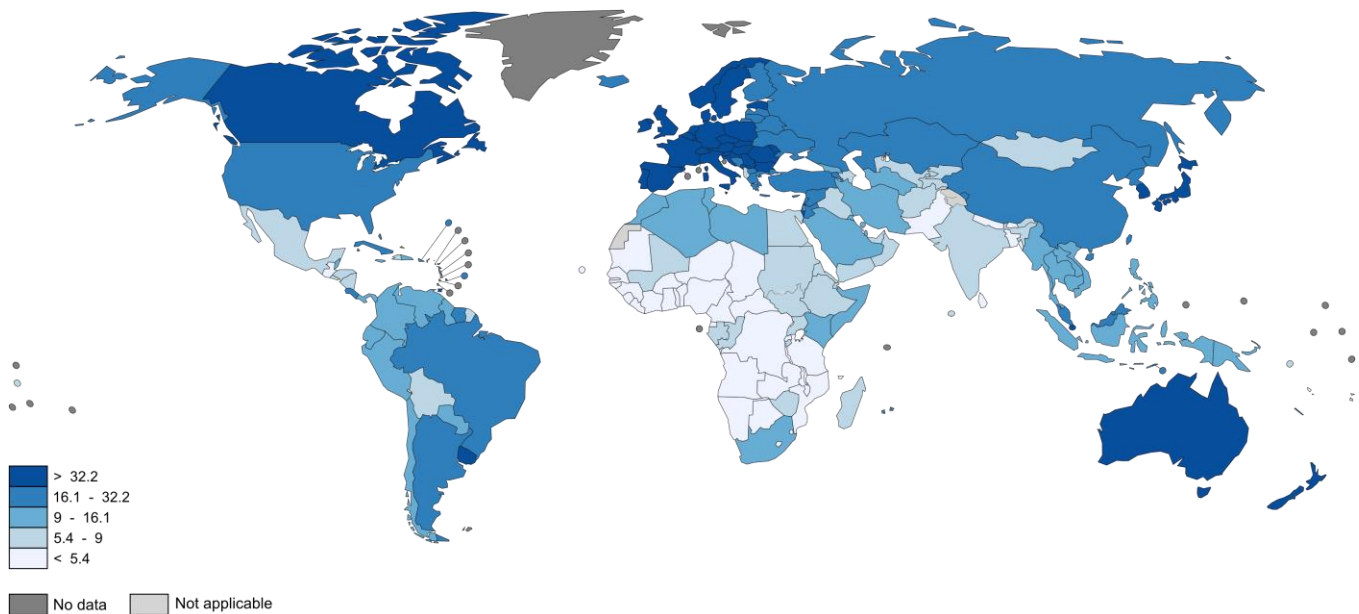


Fig. 3. Incidencia mundial de CCR. Mapa tomado de: *Globocan proyect., World Health organization (WHO). 2015.* EL mapa muestra la incidencia mundial del CCR la intensidad de color azul incrementa con respecto el incremento. Siendo así los países de Oeste de Europa, Norte de América, Australia y Nueva Zelanda lo países con mayor incidencia de CCR. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.

La mortalidad de CCR es de 694,000 muertes, 8.5% del total con más muertes (52%) en las regiones menos desarrolladas del mundo. Los rangos de mortalidad en el mundo varían con respecto a la zona geográfica, con la mayor mortalidad para ambos sexos se encuentra el Este de Europa (20.3 por cada 100,000 hombres, 11.7 por cada 100,000 mujeres) 52%, y la más baja incidencia se presenta en el nortes de África (3.5 y 3.0, respectivamente).

1.3 Factores de riesgo para la inducción de CCR

1.3.1 Estilo de vida

Los estudios epidemiológicos que asocian al CCR con el estilo de vida toman en cuentan 1) la cantidad y la calidad de la dieta, 2) el consumo de alcohol, 3) el tabaquismo y 4) el sedentarismo (Morgan G. et al., 2008; Pericleous M. et al., 2013; Lakatos P. y Lakatos L., 2008).

Estudios epidemiológicos han demostrado que personas que en promedio beben 2 copas de alcohol al día presentan 2 veces más probabilidades de desarrollar CCR con respecto a la personas que sólo beben 0.25 copas de alcohol al día (Pericleous M. et al., 2013). Una de las explicaciones más aceptada que se ha dado para explicar los mecanismo de inducción del CCR por ingesta de alcohol, es la del metabolismo normal del alcohol en el hígado, donde el alcohol se metaboliza a acetaldehído, compuesto que está considerado como cancerígeno (grupo-1) por la Agencia internacional para la Investigación del Cáncer (por sus siglas en inglés IARC) (Durko L. y Malecka-Panas E. 2014; IARC., 2009).

El tabaquismo como factor de riesgo para CCR, está asociado a la liberación de compuestos cancerígenos alquilantes presentes en los cigarrillos de diferentes marcas alrededor del mundo, (no así el tabaco consumido tradicionalmente por los abuelos nativos de Norte América, ya que este es considerado medicinal y es usado para sanar diversas enfermedades), ejemplo de estas sustancias tóxicas son las N-

nitrosaminas, compuestos orgánicos que generalmente se originan debido a la reacción de una amina secundaria con nitritos en un medio muy ácido (por ejemplo, dentro del estómago). Estos compuestos actúan sobre los nucleótidos en el ADN resultando en cambios o mutaciones puntuales de las bases nitrogenadas, otro ejemplo de estos compuestos son los hidrocarburos policíclicos aromáticos, las aminas heterocíclicas y las nitrosaminas. Estos compuestos son liberados y transportados vía del torrente sanguíneo hasta el tracto digestivo donde alquilan al DNA e inducen el riesgo de inducción de CCR (Chan A. y Giovannucci E., 2010).

Otro factor de riesgo asociado al estilo de vida es la resistencia de las células del páncreas a la insulina y la hiperinsulinemia, estos dos eventos están estrechamente relacionados con la obesidad, de este modo la obesidad se vuelve un factor de riesgo para la inducción de CCR. Los altos niveles de insulina provocan el incremento en la expresión de la proteína IGF-1 (insulin-like growth factor 1) en el colon, los altos niveles de expresión de esta proteína en el colon inhiben el proceso celular de apoptosis lo que conlleva al aumento de la proliferación celular, promoviendo de esta manera procesos de carcinogénesis (Giovannucci E., 2001). Relacionado con lo anterior el sedentarismo se ha considerado como un factor de riesgo porque las personas con baja actividad física presenten altos niveles de insulina que como ya se ha mencionado es un factor de riesgo para CCR, no así las personas que realizan actividad física de al menos 30 min al día, las cuales presentan de 20% a 30% menos probabilidad de adquirir CCR, también se ha demostrado que individuos del género masculino que pasaron ≥ 10 años en trabajos que requieren poca o nula actividad física presentaron dos veces más riesgo de desarrollar CCR, los resultados se asociaron a los bajos niveles de insulina en la sangre de los individuos. Se ha propuesto que el ejercicio promueve la motilidad del epitelio del colon lo que permite la rápida expulsión de las heces, impidiendo el contacto del epitelio del colon con las sustancias tóxicas presentes en la materia fecal (Sardo C. et al., 2014; Chan A. y Giovannucci E., 2010; Boyle T. et al., 2011).

Sin embargo se ha demostrado que la principal causa de hiperinsulinemia no se debe principalmente a la actividad física, se debe a que las personas consumen alimentos con alta cantidad de azúcares y se ha estimado que el 20% de incidencia del CCR se debe a esta razón. (Key T. et al., 2004).

Unos de los factores en la actualidad con más relevancia en la predisposición a CCR es el alto consumo de carne roja y/o procesada. Se ha estimado que la tasa de riesgo para la inducción de este tipo de cáncer 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, de esta forma la disminución del consumo de carne roja podría ser un importante factor para la prevención de CCR (Kim E. et al., 2013). El mecanismo propuesto para la inducción de CCR por consumo de carne es la inducción de hiperinsulinemia, además de que la carne contiene un alto contenido de hierro que promueve la proliferación de pólipos (acumulación de células de forma anormal) en el colon. Se ha demostrado que el hierro puede aumentar la tasa general de mutaciones en las células y promover mutaciones puntuales específicas en el DNA de tejido colónico (REF). Se ha descrito que el hierro del grupo hemo ayuda a catalizar la formación endógena de compuestos N-nitrosos, algunos de los cuales son agentes alquilantes que alteran al DNA (Gilsing A. et al., 2013). La asociación de inducción de CCR por consumo de carnes rojas es atribuida principalmente a la formación de aminas heterocíclicas que son liberadas cuando la carne se cocina, se ha demostrado que las aminas heterocíclicas inducen la formación de diversos tipos de cáncer en los ratones. La amina heterocíclica PhIP [2-amino-1 -metil-6-fenilimidazo(4,S-b) piridinil ha sido principalmente estudiada, ya que es la más abundante y los tumores colorectales inducidos por este compuesto, presentan en algunos casos inestabilidad de microsatélites así como elevado nivel de mutaciones en la proteína adenomatosa poliposa cólica (APC). El consumo de carne también altera el metabolismo del nitrógeno y a partir de éste induce la formación de moléculas cancerígenas, la cantidad de nitrógeno en el tracto digestivo es proveniente de la

cantidad de proteínas consumidas, la presencia de este nitrógeno permite la formación de compuestos N-nitrosos (NOCs). Los NOCs son producidos primariamente por la descarboxilación de aminoácidos por las bacterias de la flora intestinal, los aminoácidos son nitrosados en presencia de agentes nitrosantes como el NO y la nitración puede ocurrir en presencia de ambientes alcalinos o neutros (Chan y Giovannucci 2010; Kim et al., 2013; Pericleous et al., 2013; Hebels., 2010).

1.3.2 Enfermedades inflamatorias del intestino y flora bacteriana

Además de los hábitos alimenticios y estilo de vida, se ha propuesto que la inflamación, los mediadores del sistema inmune como las citocinas, moléculas químicas secretadas por células del sistema inmune y el mutualismo del microbioma asociado al colon son factores altamente relacionados con él . Aunque aún no se comprende por completo cómo la inflamación, la respuesta inmune y el microbioma puede desencadenar CCR, se ha demostrado que juegan un papel importante en los eventos de iniciación, promoción, progresión y metástasis (Terzic *et al.*, 2010 y Candela *et al.*, 2014).

Entre el 1%-2% de los pacientes con CCR presentan una consistente y patológica inflamación de la mucosa (Davis *et al.*, 2009), esta inflamación en el colon se relaciona en bajo o severo grado con displasia, la cual en la mayoría de los casos conlleva a la transformación neoplásica que producirá un carcinoma *in situ* y finalmente un carcinoma invasivo. Recientemente se ha demostrado la relación de la flora intestinal con la inducción de CCR, y que el tipo de respuesta inmune desencadenado por la flora bacteriana puede potenciar la inmunidad del tumor (Tomasello *et al.*, 2014).

Con relación a la inflamación, se ha determinado que las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) predisponen al desarrollo de esta neoplasia. Dentro

de las enfermedades inflamatorias del intestino encontramos a la enfermedad de Crohn (EC) y a la colitis ulcerativa (CU), que inducen inflamación crónica en el tracto digestivo. La CU se caracteriza por inducir inflamación en el recto y en el colon descendiente, mientras que la EC produce inflamación en cualquier parte del sistema gastrointestinal incluyendo el recto. Para ambas enfermedades no se conoce con exactitud su etiopatogenia (Hussein et al., 2008 y Margiotta *et al.*, 2012) Chron es autoinmune

Las irregularidades microbianas dentro de flora intestinal del colon (disbiosis) están relacionadas directamente con EII, se sabe que la disminución de la flora bacteriana puede causar alteraciones en el sistema inmune, principalmente puede conducir a la activación del sistema linfóide intestinal induciendo la producción anormal de IL-10, IFN- γ y IL-17 (Tonsello *et al.*, 2014). La patogénesis de las EII se ha relacionado con respuesta inmune adaptativa e innata. Por lo anterior podemos decir que la disbiosis de la flora intestinal está relacionada con la etiopatogénesis de EII. La incidencia de asociado a EII se ha estimado en un 10% o más y pacientes con esta enfermedad presentan mayor riesgo de recurrencia de CCR .

1.3.3 Ambiente luminal del intestino

Los restos de alimentos no digeridos que se encuentran en el intestino como proteínas, algunos compuestos derivados del nitrógeno, amonio y los fenoles producidos por la flora del colon se encuentran en contacto con las células epiteliales del lumen del colon. Se ha demostrado que la presencia de esos compuestos induce inflamación en la mucosa del colon (Birkett et al., 1996), el amonio libre es considerado como el más tóxico de esas sustancias, es fácil pensar que las células que conforman el tejido del colon y que se encuentran presentes en ese ambiente tóxico e inflamatorio, pueden adquirir mutaciones que les otorguen un fenotipo proliferativo que desencadene la formación de adenomas (Al-Lahham 2010 y World Cancer Research Fund 2011., Kilhnle et al., 2007 y Luun et al., 2007).

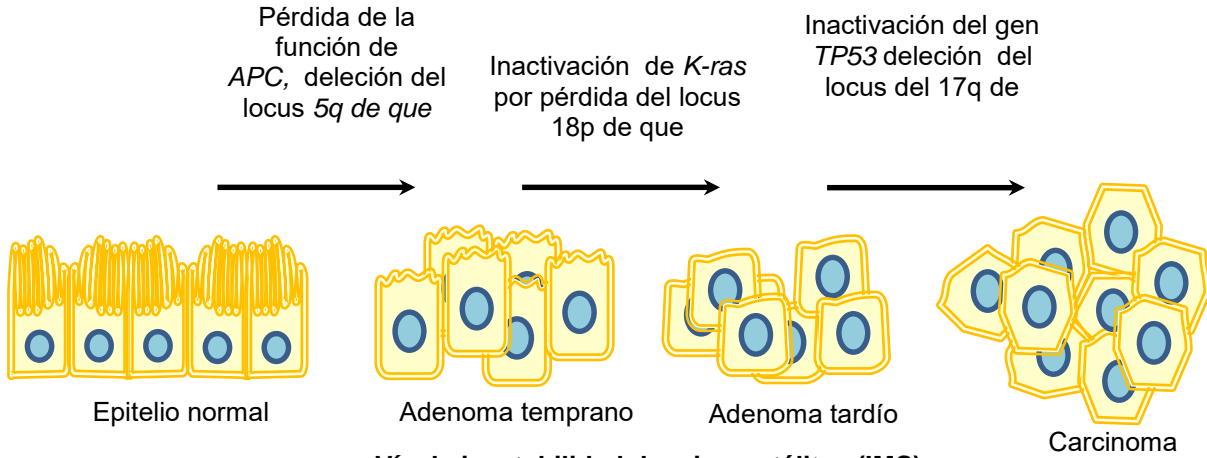
1.4 Causas moleculares del CCR

1.4.1 Inestabilidad genómica

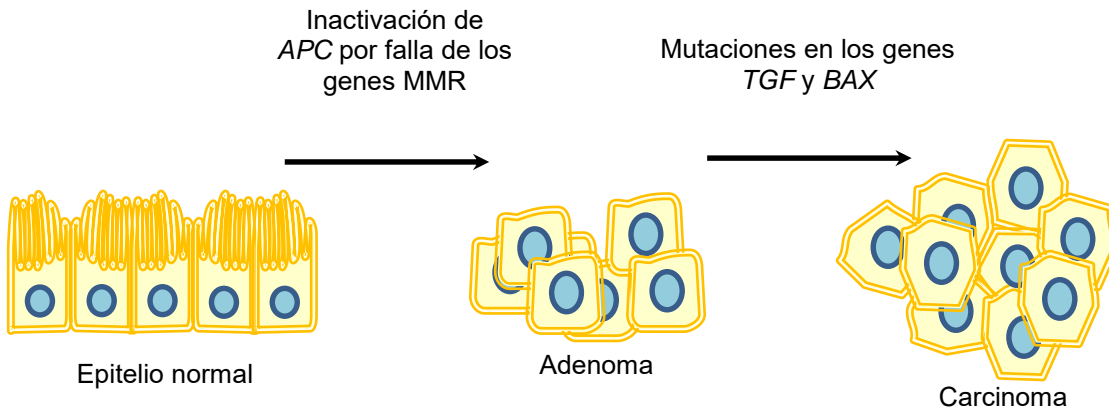
Se ha demostrado que en el cáncer las células cancerosas presentan una gran diversidad de cambios moleculares (mutaciones de genes específicamente), cada cambio molecular a su vez promueve la acumulación y la inducción de otros cambios moleculares mismos que promoverán el desarrollo de la tumorigénesis. Por esta razón para las células resulta vital el mantenimiento de su estabilidad genómica, ya que de ésta depende el correcto funcionamiento de las funciones celulares. Se han propuesto dos tipos importantes de inestabilidad genómica en el CCR, estos dos tipos de inestabilidades son independientes una de a otra, es decir los tumores que presentan una no presentan la otra, estas inestabilidades son 1) inestabilidad a nivel de cromosomas o inestabilidad cromosómica (INC) y 2) la inestabilidad de microsatélites (IMS) (Lengauer *et al.*,1997). A continuación se definen los dos tipos más importantes de inestabilidad genómica en (Fig.4).

Vías de inestabilidad genómica en CCR

Vía de inestabilidad cromosómica (INC)



Vía de inestabilidad de microsatélites (IMS)



Fenotipo de cáncer colorectal por metilación en islas CpG (CIMP)

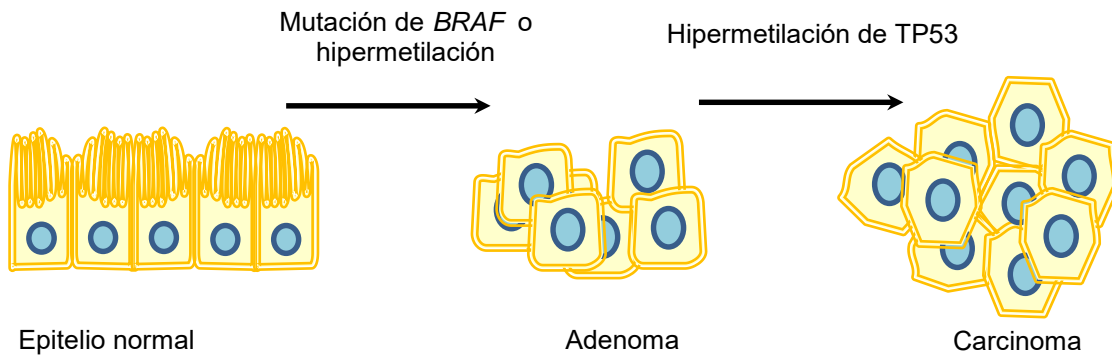


Fig. 4. Diferentes vías moleculares que desencadenan la inducción de CCR. A) Vía de inestabilidad cromosomal, B) Vía de inestabilidad de microsatélites y C) vía de fenotipo metilador de islas CpG.

1.4.2 Inestabilidad cromosómica (INC)

La inestabilidad cromosómica es un tipo de inestabilidad genómica en donde el número de cromosomas como su estructura son alterados dentro de la célula en cada división. También se define como la tasa de mitosis fallidas en la célula, donde las mitosis fallan en mantener el correcto contenido de DNA (euploidia) dando lugar a células con número de cromosomas incorrecto (aneuploidía).

La mayoría de los tumores sólidos presentan elevada tasa de aneuploidías, sin embargo estudios citogenéticos realizados en cánceres gastrointestinales han demostrado que hay recurrencia en la pérdida de ciertos cromosomas, tal es el caso del cromosoma 17 que se pierde con frecuencia o el rompimiento de su brazo corto y la frecuente aneuploidía del cromosoma 18 en CCR y en cáncer gástrico (REFS). Además de estas alteraciones ya mencionadas se ha reportado la elevada cantidad de monosomías, trisomías y tetrasomías de cualquier cromosoma (Muleris *et al.*, 1990). Aportó que el incremento de aneuploidías se debe a la inestabilidad cromosómica. Así se demostró mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en diferentes líneas celulares de cáncer colorectal, en este trabajo demostraron que había líneas celulares que presentaban alto grado de aneuploidías y otras líneas que no presentaban aneuploidías. La mayoría de las células con aneuploidías presentaron cambio en la cantidad de todos sus cromosomas, mientras que la mayoría de las líneas celulares de cáncer sin aneuploidías presentaron euploidia (células con numero correcto de cromosomas) en todos sus cromosomas, en un mismo porcentaje que células normales (se compararon con linfocitos). De esta forma se demostró que molecularmente hay dos subtipos de CCR, uno que presenta alta tasa de alteraciones cromosómicas o INC y otro sin alteraciones en la pérdida numérica de cromosomas pero con alteraciones en las regiones de microsatélites o IMS (Lengauer *et al.*, 1997).

Aproximadamente del 75-80% de los CCRs se desarrollan por la vía de INC (Fig. 5). En esta vía ocurren aberraciones debido a la acumulación de alteraciones numéricas o estructurales de los cromosomas (Villela., *etal.*2008). La lesión tisular característica que indica INC es la formación de fosas crípticas aberrantes (CAF) (Takayama *et al.*, 2001). Las CAFs son una lesión microscópica que precede a la formación de un pólipo. La vía de INC está asociada a mutaciones en el gen *APC* y/o pérdida del cromosoma 5q que contiene al gen *APC*, mutación del gen *KRAS* y/o la delección del cromosoma 17q y pérdida del cromosoma 18p que contiene al supresor de tumor *TP53* que también podría sufrir una mutación (Grady, 2004). *APC* decide si siempre que te refieras al gen va a ser con script o con letra normal es un gen muy importante para el desarrollo de CCR por la vía de INC, generalmente las inactivaciones de *APC* conllevan a su inactivación y por lo tanto alteraciones en la función de la proteína, que se encarga de secuestrar a la proteína β -catenina en la vía de señalización de *Wnt* que a su vez controla el crecimiento celular, apoptosis, diferenciación pero principalmente se encarga de regular a las células stem, mismas que darán origen a todos los tipos celulares del colon. Frecuentemente adenomas tempranos presentan un alto nivel de mutaciones en *APC* o *β -catenina* (80%), y específicamente se ha reportado que *APC* se encuentra mutado en el 60% de los cánceres de colon y en el 82% de los colorectales (Jass *et al.*, 2002).

KRAS es otro importante gen presente en la vía de INC. Este gen codifica para una GTPasa y cuando es inactivado conduce a la activación constitutiva de la vía de señalización RAS-RAF-MEK-ERK (Leslie *et al.*, 2002). Esta mutación se encuentra en 35-42% de adenomas colorectales avanzados (Shen *et al.*, 2007).

DCC, *SMAD2* y *SMAD4* están localizados en el cromosoma 18q21.1 y el 60% de los CCRs presentan esta pérdida (Volgelstain *et al.*, 1988). Tanto *SMAD2* y *SMAD4* están relacionados con la vía de señalización de TGF- β que se encarga del

crecimiento y apoptosis. Mutaciones germinales de SMAD4 puede inducir síndrome poliposo juvenil que se asocia fuertemente al CCR (Bevan *et al.*, 1999).

Finalmente el supresor de tumor *TP53* cuando se inactiva por la delección del17q promueve la transformación de un adenoma tardío a un carcinoma, el 75% de los adenomas tardíos con invasión de criptas fósicas invasivas presentan esta alteración. Estas alteraciones tienen como consecuencia modificaciones en los mecanismos de reparación del ADN (Leslie *et al.*, 2003).

Las causas de INC se relacionan directamente a alteraciones en la división celular y mutaciones. En el punto de monitoreo de la mitosis o *checkpoint* de la mitosis, la célula se asegura que el material genético se segregue correctamente a la célula hija. Entre los eventos importantes que se resguardan en el *checkpoint* de la mitosis está el correcto alineamiento de los cromosomas en el huso mitótico durante la metafase así como la correcta unión de los microtúbulos al centrómero de los cromosomas. Las proteínas encargadas de censar la correcta segregación de los cromosomas son las BUB1 y BUBR1. Se ha demostrado tanto en CCR como en cáncer gástrico que mutaciones en estas proteína pueden inducir INC. También se ha demostrado que mutaciones en las proteínas MAD1 y MAD2 inducen INC en cáncer de mama y leucemia (Grabsch *et al* 2003 y Michel *et al.*, 2001). También se ha reportado que la cantidad y función de los centrosomas puede inducir INC, ya que estos al igual que el huso mitótico cumplen un papel fundamental en la segregación de los cromosomas, lo anterior se demostró en cáncer de próstata y mama (Lingle *et al.*, 2002 y Piah *et al.*, 2001).

Aunque la presente investigación se enfocará principalmente en la vía de INC, es importante explicar todas las vías por las cuales se desencadena el CCR, por lo que a continuación abordaremos otras vías.

Vía de inestabilidad

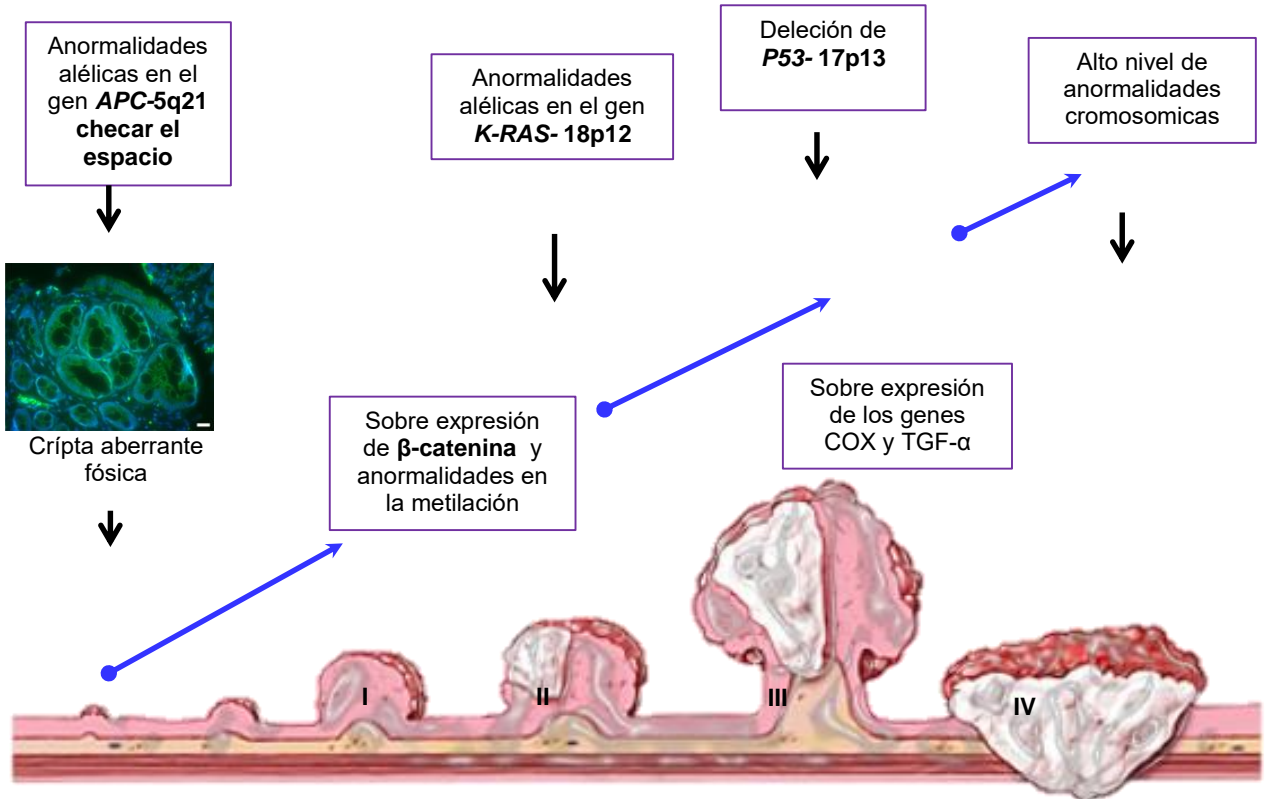


Fig. 5. Vía inestabilidad cromosómica. Clásicamente se ha definido como la tasa de ganancias y pérdidas completas de cromosomas. Mediante esta vía se desarrollan la mayoría de los CCRs. Consiste en la pérdida alélica del locus 5q21 del gen de *APC* lo que induce la formación de una cripta aberrante (estadio I), Después ocurre una deleción del locus 18p12 del gen *K-RAS* que induce un tumor más grande (estadio II) y por último la deleción del gen *TP53* ubicado en el locus 17p13 (estadio 4). En esta vía puede haber deleciones o pérdidas completas de los cromosomas.

1.4.3 Inestabilidad de microsatélites (IMS)

Los microsatélites son un tándem de secuencias repetidas no codificantes constituidas por dos regiones flanqueantes. En él se han descrito un subgrupo de tumores que presentan inestabilidad de microsatélites (IMS) deleciones o inserciones de mono, di, tri o tetra-nucleótidos en estas regiones. El “mismatch repair” MMR es el sistema que se encarga de corregir esas mutaciones en estas regiones y se encuentra inactivo en este subgrupo de tumores, esto trae como consecuencia la inestabilidad de regiones no codificantes y codificantes, misma que induce mutaciones germinales en alguno de los genes que conforman el MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, o *TACSTD1/EPCAM*). La presencia de hipermetilación de promotores del MMR también induce CCR. Por lo tanto la IMS puede tener un origen genético (síndrome de Lynch) o un origen esporádico (tumores con IMS metilados) (Wimmer K *et al.*, 2014). La IMS refleja la variación de tamaño de las secuencias que conforman el microsatélite mismas que pueden inducir mutaciones en regiones codificantes del genoma que conducen a la inducción de cáncer o genes que conlleven a algún tipo de inestabilidad genómica. Se ha estimado que hay 30 genes alterados con relación con IMS en tumores, genes relacionados con diversas funciones celulares y diversas rutas (Viguera E. *et al.*, 2001). Algunos de los genes que se han involucrado son *BRAF*, genes de la vía *PI3K/AKT/mTOR* y *Wnt*. Si comparamos las vías de IMS y INC tenemos que la vía IMS presenta mayor frecuencia de mutaciones en los genes *TGFBR2*, *TCF7L2*, *FZD3* y menos mutaciones en *APC* (leggett B. *et al.*, 2010).

La detección de los tumores con IMS es más frecuente en la fase II del CCR (20%) que en fase III (12%) y son mucho menos frecuentes en fase IV (4%), son mayormente diagnosticados en pacientes de la tercera edad de 70 años, y en pacientes más jóvenes de 50 años con casos familiares de CCR. Los tumores formados por IMS presentan alto grado de displasia, fenotipo con prominente

cantidad de tumores infiltrados con linfocitos y ausencia de alto grado de necrosis (Kaemmerer E. *et al.*, 2013).

1.4.4 Fenotipo de cáncer colorectal por metilación en islas CpG (CIMP)

En la actualidad podemos decir que el CCR es una neoplasia que se desarrolla por múltiples vías, así que podemos resumir que el CCR se puede desarrollar 1) por mutaciones en genes que codifican para proteínas del sistema de reparación “mismatch repair” que traerá como consecuencia un fenotipo de IMS, 2) mutaciones en APC y de otros genes que activan la vía de señalización *Wnt* que se caracteriza por inducir un fenotipo INC y 3) un perfil global de hipermetilación que resulta en el silenciamiento de supresores de tumor desencadenando un fenotipo de hipermetilación de islas CpG.

La regulación epigenética de expresión de genes es un fenómeno normal de las células que conforman los tejidos y es un importante mecanismo de preservación de la estabilidad genómica, desarrollo embrionario y diferenciación de tejidos (Fig.6) (Kim Y., *et al.*, 2007).

Las islas CpG por sus siglas en inglés (cytosine preceding guanine) son regiones dentro del genoma que se encuentran principalmente en secuencias promotoras de genes, generalmente se presentan como regiones con alta cantidad de CpG dinucleótidos. Muchos sitios CpG que son metilados normalmente en las células se desmetilan en cáncer. En algunos otros tipos de cáncer las islas CpG se hipermetilan, induciendo silenciamiento anómalo de genes, este fenotipo ya se ha reportado en diversos tipos de cánceres de pulmón, gastrointestinal, hígado, ovario, glioblastoma, endometrial, mama, leucemia y CCR (Hagland H. *et al.*, 2013).

El proceso de metilación es llevado a cabo por enzimas que transfieren un grupo metilo en el carbono 5 de las citosinas. Estas enzimas reciben el nombre de dimetiltransferasas (DNMT) que producen 5-metilcitosina y generalmente utilizan como sustrato las regiones del genoma ricas en G y C. En CCR se han identificado

patrones de metilación aberrantes: la denominada tipo A relacionada con la edad y la tipo C donde se asocia exclusivamente a tipos de con CIMP. En el tipo A se asocia a la pérdida de la función fisiológica del colon por la edad y la metilación de genes relacionados con el crecimiento y diferenciación celular como ESR1, IGF2 y TUSC3, se ha asociado a este tipo de cáncer. El grupo de cáncer de colon asociado a alteraciones de metilación, presentan tumores con características morfológicas e histológicas particulares (Fig. 6). Se han reportado alteraciones de hipermetilación en los promotores de los siguientes genes que además se silenciaron: *CDK2A*, *CXLC12* y *MHL1* (Cunningham J et al 1998; Hughes L et al., 2012).

Patrones de metilación en células normales y de cáncer

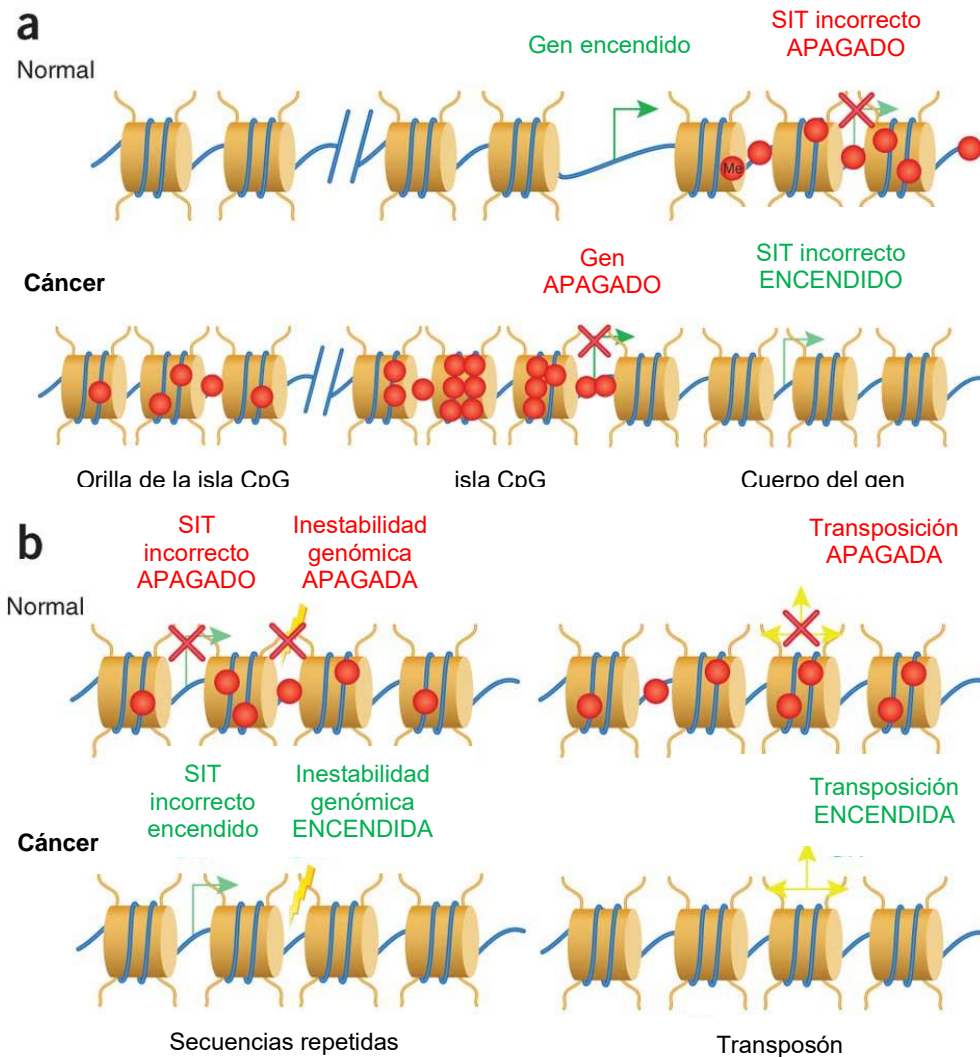


Fig. 6. Existen patrones de metilación en las células normales y de cáncer. La metilación del DNA se encuentra a lo largo del genoma, su alteración es un hallmark del cáncer. a) en las células normales las islas CpG permanecen desmetiladas, permitiendo la transcripción. Adicionalmente la metilación del DNA evita una activación de la transcripción de genes errónea. Por el contrario las células cancerosas las islas CpG pueden estar fuertemente metiladas pero los cuerpos de los genes carecen de esta metilación. Como resultado la transcripción de muchos genes se bloquea, además puede ocurrir una transcripción aberrante por errores de metilación en los sitios de inicio de la transcripción (SIT). b) En las células normales los repetidos que determinan zonas de metilación previenen la inestabilidad genómica de un inicio erróneo de la transcripción. Por otra parte elementos transponibles no pueden ser activados si hay hipermetilación. En las células de cáncer existe alto grado de hipometilación que conlleva a la inestabilidad genómica y sitios aberrantes de la transcripción. Una activación de transposones concomitantemente conlleva a la ruptura de genes.

1.5 Nanopartículas de dióxido de titanio (NP-TiO₂) grado alimenticio (E171)

Las nanopartículas de TiO₂ (NPs-TiO₂) son un polvo blanco, cristalino, sólido, que se utiliza generalmente en pinturas, barnices, cosméticos, plásticos, papeles y en alimentos se utiliza principalmente como colorante y texturizante. La producción de NPs-TiO₂ es de 1.45 millones de toneladas métricas por año (Skocaj et al., 2000). Las NPs-TiO₂ son un material fotocatalítico que cuando es iluminado con fotones $\lambda \leq 380$ nm un electrón es excitado de la banda de valencia a la banda de conducción, generando un hueco por la pérdida de un hidrógeno en la banda de valencia (Fig.7).

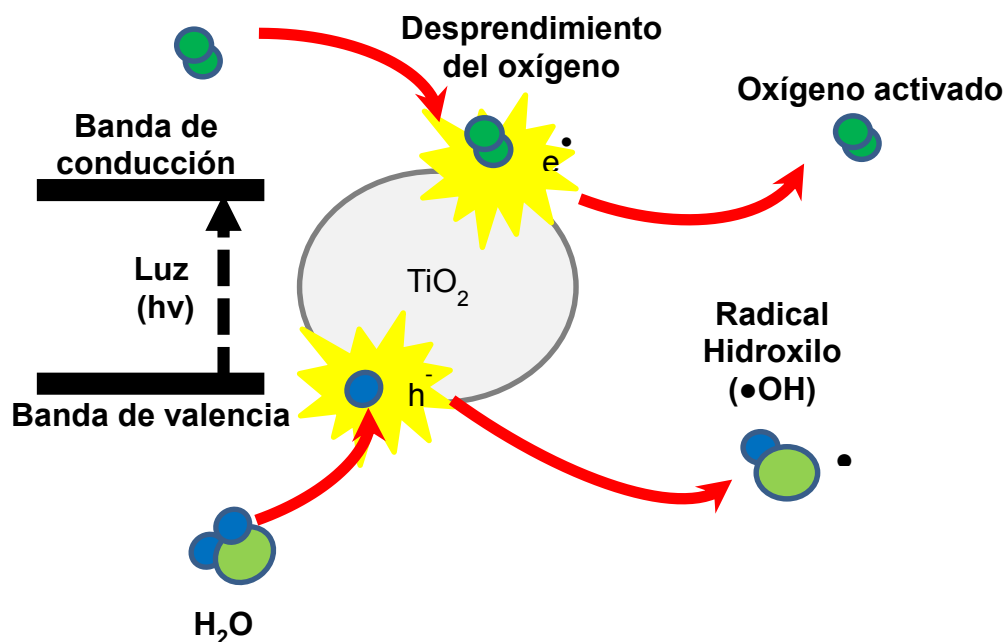


Fig. 7. Propiedad fotocatalítica de las NPs-TiO₂. Reacción fotocatalítica de una molécula de agua al estar en contacto con una NP-TiO₂, donde el electrón liberado por la excitación de la partícula por la incidencia de un fotón rompe a la molécula de H₂O formando radical hidroxilo y oxígeno activado. Cuando el fotón incide en la partícula un electrón es liberado de la banda de valencia a la banda de conducción.

en el grupo 2B-como “posibles carcinógenos para humanos” (IARC., 2010) (Boyle and Levin., 2008). En 2011 el Instituto Nacional Para la Salud Ocupacional (NIOSH, por sus siglas en inglés) clasificó al TiO₂ como un potencial carcinógeno por

exposición ocupacional para humanos y recomendó no exponerse a concentraciones de NPs-TiO₂ mayores de 0.3 mg/m³/10h/día/. Se estima que si se atiende dicha recomendación el riesgo de contraer cáncer de pulmón será por debajo de 1 en 1000 (Weir et al., 2013). En la industria alimenticia se ha clasificado a las NPs-TiO₂ con el número E171, este número se refiere a que son moléculas utilizadas como un aditivo de color blanco (Weir et al., 2013). Por esta razón y con la finalidad de entender que en el presente trabajo se utilizará NPs-TiO₂ que se utiliza en la preparación de alimentos, se nombrará a este compuesto como “E171”. En Estados Unidos se ha estimado que un niño en promedio consume de 1 a 2 mg/kg/día de E171 y los niños en Reino Unido consumen de 2 a 3 mg/kg/día (NIOSH., 2011). En la actualidad van en incremento los alimentos que utilizan E171, por lo que la exposición a estas partículas por esta vía oral incrementará en los próximos años (Lomer et al., 2011).

1.5.1 Efecto de la exposición a E171 en colón de ratones

En la actualidad se han realizado modelos animales para determinar los órganos que se alteran cuando las E171 se ingieren por vía oral. Wang *et al*/2013 estudiaron la distribución de las E171 cuando son administradas por vía oral en ratas de la cepa Sprague-Dawley, utilizando una concentración de 5mg/rata/día. Encontraron que las E171 se acumularon sólo en la mucosa del sistema gastrointestinal incluyendo al colon, no encontraron acumulación de E171 en hígado. Onischenko *et al.*, 2012 estudiaron en ratas la internalización de E171 (10-25 nm) por enterocitos en un experimento *in-situ*, donde introdujeron a través de un corte en el intestino delgado. En experimentos paralelos estudiaron la distribución de por vía oral (1mg/kg/día y 100 mg/kg/día) durante 28 días. Encontraron internalización por los colonocitos, acumulación en la mucosa del intestino delgado y acumulación en hígado con la concentración de 100mg/kg/día. Wang *et al.*, 2007 estudiaron la distribución de (25-80 nm y 155 nm) en ratones CD-1 por vía oral en un vehículo de hidroxipropilmetilcellulosa. Encontraron que las de 25, 80 y 155 nm se acumularon

en los riñones, pulmones y bazo pero principalmente en la mucosa de tracto digestivo. Sycheva *et al* 2011 estudiaron el efecto de las (33 y 160 nm) por exposición oral en diferentes órganos, utilizando las dosis de 40, 200 y 1000mg/kg/ durante 7 días por exposición oral en ratones CBAB6F1. Encontraron que a cualquier concentración a partir de la de de 40mg/kg hubo daño en hígado, riñón, cerebro, testículos y las siguientes alteraciones en colon: 1) incremento en el índice mitótico 2) incremento de células binucleadas y multinucleadas 3) decremento de células apoptóticas.

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* con exposición intragástrica a E171 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 celular en 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 E171 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 intragástricamente 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 incrementó de forma dosis-dependiente mientras que HSP-70 y Iκβ decrecieron (Gui S. *et al.*, 2011).

1.5.2 Evidencia de genotoxicidad por exposición a NPs-TiO₂

Por otro lado, a nivel celular se han realizado diversos estudios para investigar cuáles son los mecanismos por los cuales la exposición a NPs-TiO₂ puede favorecer el desarrollo de cáncer. En este sentido, se ha demostrado que las NPs-TiO₂ inducen cambios estructurales en los cromosomas, como formación de micronúcleos (MN) (Lu et al 1998), intercambio de cromátides hermanas (SCEs) y daño al DNA inducido por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en diferentes cultivos celulares y en modelos animales (Gurr et al 2005 y Wang et al 2007). Lo anterior sugiere que la exposición a NPs-TiO₂ induce algún tipo de inestabilidad genómica, misma que se ha descrito como una característica de células cancerosas. Algunos tipos de inestabilidad genómica que se han descrito son las siguientes: 1) Inestabilidad en regiones de microsatélites, 2) inestabilidad cromosómica (INC), que abarca translocaciones cromosómicas y alteraciones en el número de cromosomas, y 3) mutaciones puntuales en secuencias de nucleótidos y amplificación de genes (Terzic et al., 2010). Cabe destacar que por el tipo de genotoxicidad que induce la exposición a NPs-TiO₂ podemos suponer que podrían inducir un tipo de inestabilidad genómica, particularmente porque tiene la capacidad de inducir la pérdida del material genético.

1.5.3 NPs-TiO₂ como posibles causantes de INC

Como habíamos mencionado anteriormente la INC es la tasa de pérdida o ganancia de cromosomas durante la división celular y ocurre por defectos en diversos procesos, entre ellos alteración en la dinámica de los microtúbulos, errores en el punto de monitoreo de la mitosis, defectos en la regulación de los centrosomas y alteraciones en la cohesión de cromátidas hermanas (López-Savedra y Herrera., 2010). Específicamente, se ha observado que la exposición a NPs-TiO₂ en tiempos largos (12 semanas) altera la progresión mitótica de fibroblastos inmortalizados de ratón, así como la inducción de células multipolares y alteraciones en la segregación cromosómica (Shing et al., 2010). Por otro lado se ha demostrado que la exposición

a NPs-TiO₂ induce la formación de MN en fibroblastos de ratón, en células broncoepiteliales y en linfocitos de humanos (Gurr et al., 2005; Wang et al., 2007; Huang et al., 2009). Los resultados anteriores son relevantes ya que la aparición de MN es una muestra de alteraciones cromosómicas, debido a que se pueden originar por rompimientos en los brazos de cromosomas o por la pérdida de cromosomas completos (Fenech et al., 2009). Sin embargo, no se ha descrito que si la formación de MN por la exposición a NPs-TiO₂ podría estar activando la vía tradicional de inducción de cáncer colorectal.

1.5.4 Evidencia de que las NPs-TiO₂ dañan la estructura de microtúbulos (Mts)

Algunos de los mecanismos que inducen INC se deben a defectos en el ensamblaje del huso mitótico, o defectos en la unión de los microtúbulos al cinetocoro durante la mitosis; en ambos procesos se encuentran directamente relacionados los microtúbulos del citoesqueleto celular. Un estudio enfocado en determinar las posibles alteraciones ocasionadas por interacción de las NPs-TiO₂ con los microtúbulos MTs, demostró que la exposición a éstas promovió alteraciones en la polimerización de tubulina y estabilización de los microtúbulos (Gheshlaghi et al., 2011). Los resultados anteriores sugieren que dichas alteraciones podrían tener como consecuencia la inducción de errores en la segregación de cromosomas, sin embargo, hasta el momento se desconoce si las alteraciones en la estabilización y polimerización de MTs por exposición a NPs-TiO₂ está asociada a la pérdida de cromosomas completos o a INC.

Modelo animal de CCR con ratones BALB/c, azoximetano y dextrán sulfato de sodio (AOM/DSS)

La inducción de tumores colorectales 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 carcinogénico indirecto que se ha usado para inducir CCR es el

azoximetano (AOM) que induce la formación de tumores porque es un agente alquilante del 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 una vez que se administra 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). Gracias 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 (Arthur y Jobin., 2011; Matsumoto H. *et al.*, 1979; Neufert *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 *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 y Cerar *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 *et al.*, 2000).

Si bien se han usado modelos animales para estudiar el CCR (Terzoc *et al.*, 2010) (Tanaka *et al.*, 2003), uno de los más utilizados es el de AOM/DSS. El AOM es un agente mutagénico que se administra por vía intraperitoneal, que sumado con un agente que altere directamente el epitelio del colon como el DSS induce CCR (Thaker *et al.*, 2012). La principal ventaja de este modelo es que se pueden inducir tumores en un lapso de 7-10 semanas (Neufer *et al.*, 2007) y el uso de AOM/DSS desencadena las mismas alteraciones genéticas que en el esporádico (alteraciones en los genes APC, p53, Msh2 etc). En el presente trabajo utilizaremos el modelo inducido con AOM/DSS (CCR+E171) para evaluar la posible contribución de las

E171 en la inducción de tumores colorectales o la posible predisposición a éstos cuando se administran por vía intragástrica, de igual forma evaluaremos la capacidad de las E171 en la inducción de tumores.

2. Pregunta experimental:

¿La exposición intragástrica a E171 potenciará la aparición de tumores en un modelo in vivo de ratones con CCR y se asociaran a alteraciones genómicas inducidas por exposición a E171 en un modelo in vitro de células HCT116?

3. Hipótesis

La exposición intragástrica a E171 inducirá la aparición de tumores en el colon de ratones sanos y potenciará la aparición de tumores en el colon de ratones a los que se les inducirá CCR con AOM/DSS. Dichas alteraciones se asociaran a errores genómicos inducidos en células HCT116 por la exposición a E171.

4. Objetivos

- a) Determinar mediante un modelo *in vivo* si la exposición intragástrica a partículas de E171 induce o potencia la aparición de tumores en el colon de ratones.
- b) Determinar en cultivo in vitro de células HCT116 la inducción de alteraciones genómicas por exposición a E171.

4.1 Objetivos específicos

4.1.1 Modelo *in vivo*

1.- Determinar el tamaño en peso seco y en agua de las partículas de E171 así como su índice de polidispersión.

- 2.- Determinar si la exposición intragástrica a E171 potencia la aparición de tumores en colon de ratones BALB/c con CCR inducido con AOM/DSS.
- 3.- Evaluar histológicamente en los tumores formados el grado de displasia mediante la inmunofluorescencia de los marcadores: Ki67, COX-2 y β -catenina.
- 4.- Determinar la internalización de partículas de E171 en el colon mediante el análisis de cultivo primario de colon de los diferentes grupos.
- 5.- Determinar la expresión de las interleucinas IL-2, TNF- α , INF- γ , IL-10, GM-CSF en tejido de colon de los diferentes grupos de tratamiento.

4.1.2 Modelo *in vitro*

- 1.- Determinar morfología de células HCT116 e internalización de las partículas de E171 mediante la técnica de H&E.
- 2.- Evaluar la citotoxicidad de las partículas de E171 sobre las células HCT116, mediante la técnica de azul tripano.
- 3.- Evaluar el daño genotóxico que inducen las partículas de E171 en células HCT116, se utilizará la técnica de micronúcleos (MNs) mediante bloqueo de la mitosis con citocalacina B.
- 4.- Evaluar la interacción de las partículas de E171 con los microtúbulos que conforman los husos mitóticos de células HCT116, empleando microscopía de epifluorescencia detectando la proteína α -tubulina.

5. Estrategia experimental

Modelo *in vivo*

5.1 Análisis de las partículas E171

Las partículas de TiO₂ fueron obtenidas de la empresa SENSIENT COLORS (número de color CI 77891 denominadas como E171, 99% de TiO₂). Tamaño y morfología de las partículas de E171 fueron caracterizadas mediante el microscopía electrónica de barrido (JEOL 5800-LV, Japan, 5,000X, 15Kv). Los aglomerados y

morfología fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión (JEOL JEM 1010, Japan, 75,000X 60Kv). El espectro raman de las partículas de E171 fueron medidos en el rango espectral de 300-2000 cm^{-1} (espectrómetro raman dispersivo Almega XR). Los espectros Raman se acumularon más de 25 s con una resolución de $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$, la fuente de excitación fué de 532 nm de radiación con un láser de Nd: YVO4 (de doble frecuencia) y la potencia del láser en la muestra fue de 2,5 mW.

5.2 Inducción de CCR en ratones y administración de E171

El trabajo experimental con ratones fue realizado bajo los estatutos de la NOM-062-ZOO-1999, NOM-087- ECOL-1995 y el protocolo de cuidado y uso de los ratones de laboratorio (PICUAL). Realizamos cuatro grupos de seis ratones machos de la cepa BALB/c, de 4-6 semanas de edad, cada grupo fue aislado en cajas de policarbonato con las siguientes condiciones de bioterio: 21 °C, humedad relativa de 50-60%, 12 h de ciclos de luz y oscuridad. Fueron alimentados con comida comercial para ratones de la marca Harland Teklad Madison, WI, USA. Después de una semana de aclimatación, los ratones fueron divididos aleatoriamente para formar los siguientes grupos experimentales; 1) grupo Control, 2) grupo E171, 3) grupo CCR y 4) grupo CCR+E171. El grupo control recibió una inyección intraperitoneal de solución salina. 1 mg de partículas de E171 fueron esterilizadas, re suspendidas en 1 ml de agua y sonicadas durante 30 min a 60Hz, mismas que fueron administradas a los ratones del grupo E171 con una dosis de 5 mg/kg en un volumen final de 100 μl . Se administraron de lunes a viernes durante 10 semanas. El grupo de ratones CCR recibieron una dosis única de azoximetano (AOM) de 12.5 mg/kg mediante una inyección peritoneal, además se les administró *ad libitum* en agua 2% de dextrán sulfato de sodio (DSS) en la tercera, sexta y novena semana. A los ratones del grupo CCR+E171 además de la administración de AOM+DSS también se les administró intragástricamente E171 de acuerdo al protocolo de administración de E171 del grupo E171. Después de la semana 11 fueron sacrificados en cámara

húmeda con sevoflorano, se disectaron el colon, los riñones, el bazo, los pulmones y se recolecto la sangre de los ratones.

5.3 Histología de colon

El colon de los ratones fue disectado y abierto para inmediatamente ser fijado en paraformaldehido 4% por inmersión. Las muestras del tejido fueron deshidratadas en un gradiente de concentración de alcohol etílico, posteriormente fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes histológicos de 3 mm. Los cortes fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina (SIGMA, cat. HHS16) eosina (SIGMA cat. E4009).

5.4 Cultivo primario de colonocitos

Se extirparon del colon distal dos milímetros cuadrados de cada grupo experimental de ratones, se lavaron con PBS estéril y se cultivaron en medio RPMI con 15% de suero fetal bovino y 10 % de antibiótico. Se mantuvieron cultivados durante 7 días para posteriormente ser fijados con 2% de glutaraldehído durante 2 h, posteriormente se analizaron mediante microscopía electrónica de transferencia.

5.5 Análisis de progresión tumoral

La progresión tumoral fue evaluada mediante la detección de la expresión de las proteínas COX2, β -catenina y Ki-67 (anticuerpos β -catenina, Abcam ab16501; COX2, Genetex GTX1591; Ki67, Biolegend 652402). Los cortes de 3 mm fueron incubados con los anticuerpos primarios a 4 °C durante toda la noche e incubados anticuerpos secundarios (TRITC, Santa Cruz 111-025 and FITCI, Santa Cruz 64419) a 37 °C durante 2 h. Las muestras fueron analizadas mediante microscopía convencional de fluorescencia (Zeiss Vert. A1) y la cuantificación de fluorescencia se realizó mediante el microscopio confocal de fluorescencia LEICA TCS SP2 (El

Área de cada muestra cuantificada fue de 2,8 mm² y por cada muestra se analizaron 20 campos de 50 mm²).

5.6 Cuantificación de células caliciformes

Corte de colon de 3 mm fueron incubados en 1% del colorante azul aliciano en solución de ácido acético y con el colorante rojo nuclear 0.1% en 5% de sulfato de aluminio durante 10 min. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio óptico con un aumento de 60X. Se contaron las células caliciformes que se tiñeron en cada muestra.

5.7 Detección de interleucinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-10 and GM-CSF en tejido de colon

Se homogeneizaron los tejidos de colon con buffer RIPA y las interleucinas se detectaron usando el kit de detección de interleucinas “Bio-Plex multiplex MAGPIX with BioPlex Pro Mouse Cytokine 8-plex kit” (BIO-RAD cat. M60-000007A). Brevemente, se utilizó 50 ml solución de microesferas para cada muestra y se incubó con agitación (850 \pm 50 rpm) durante 30 min y se incubaron con 25 ml del kit de anticuerpos a temperatura ambiente.

5.8 Análisis estadístico

Los datos estadísticos del peso de los ratones, el consumo de agua y alimento, así como el peso de los riñones, el bazo, el hígado y los pulmones son presentados como la media de 6 animales. El número de tumores está representado como la media \pm el error estándar. Las unidades de fluorescencia relativa de la expresión de COX2, β -catenina, Ki67 y el conteo de células caliciformes son representadas como la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Después de calcular la distribución normal, los grupos fueron comparados con un análisis no paramétrico usando el test de Manne Whitney U, con intervalos confidenciales de

95%. Las diferencias significativas de los valores fueron consideradas a partir de *p < 0.05.

Modelo *in vitro*

5.9 Cultivo de células HCT116

La línea celular de adenocarcinoma de colon (HCT116) fue obtenida de “American Type Culture Collection” (ATCC® CCL-247™). Las células HCT116 fueron incubadas a 37°C y se mantuvieron en una atmósfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂), en medio McCoy 5^a-modificado con 1.5 mM de l-glutamina y 2.2 mg/mL de bicarbonato de calcio (*in vitro*, no. cat. ME-042), suplementado con 10% de FBS (Biowest, no. cat. US1520).

5.10 Tinción de células HCT116 con H&E

Las células CT116 fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 2 h en agitación constante. Se incubaron en hematoxilina de Harris durante 30 s y en eosina durante 1 min a temperatura ambiente. Las células fueron montadas sobre cubreobjetos y selladas con PBS-glicerol 1:3. Se analizaron en un microscopio óptico con un aumento de 60X.

5.11 Viabilidad de células CHT116

Para evaluar la viabilidad celular se utilizó la técnica de azul tripano. Las células HCT116 fueron expuestas a 0, 5, 10, 50 y 100 µg/cm². Las células fueron lavadas con HBSS posterior a la tripsinización y se contaron con la cámara de Neubauer, las células vivas se identificaron con el colorante de azul tripano (0.4%) a 10 µL de suspensión de células (1:2) (Proquin et al., 2016).

5.12 Técnica de Micronúcleos(MNs)

Esta sección fue elaborada por Carolina Rodríguez Ibarra y son parte de su trabajo de tesis que lleva por título: “Genotoxicidad inducida por la exposición a dióxido de

titanio grado alimenticio (E171) en células de cáncer colorectal” estos resultados complementan la presente tesis y son parte del artículo de (Proquin et al., 2016).

Cultivamos 150 000 células CHT116 en cubreobjetos de 6 cm² y fueron expuestas a 0, 5, 10 y 50 µg/cm² de partículas de E171 durante 24h. La metodología de micronúcleos fue elaborada según Fenech 2010. Para obtener células binucleadas después del tratamiento durante 24 h con E171 se lavaron con PBS estéril y se trataron con Citocalacina-B 4.5 µg/mL B (Cyt-B; Sigma-Aldrich, no. cat. C6762) por 24 h. Las células fueron fijadas con paraformaldehído 3% por 1 h y teñidas con Hoescht 1:200 (Thermo Scientific, no. cat. 62249) a 37°C en constante agitación. Se analizaron en un microscopio de epifluorescencia an Axio Vert. A1 Carl Zeiss fluorescence microscope at ×1000. Se contaron 1000 células binucleadas con MNs (Proquin et al., 2016).

5.13 Interacción de partículas con el huso mitótico

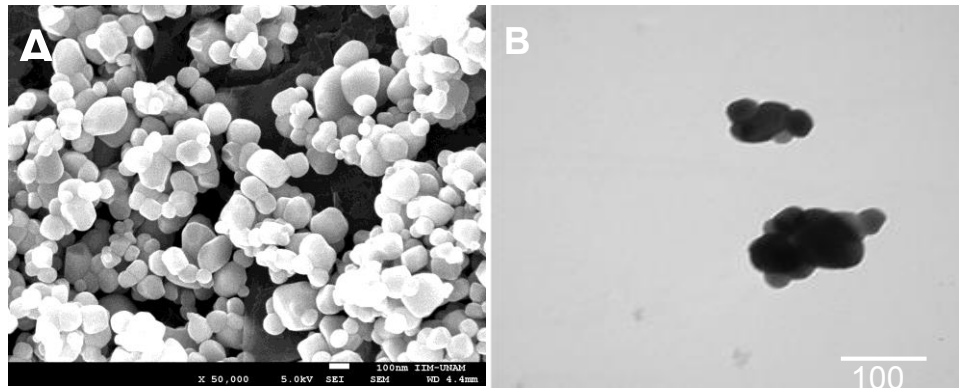
Las células HCT116 se sembraron (1.5 x 10⁵ células) sobre cubreobjetos. Las células fueron expuestas a 5, 10, 50 and 100 µg/cm² por 24 h. Las células fueron detectadas con el anticuerpo 1:200 contra α-tubulina y 4',6-diamidino-2-fenilindole (1 µg/mL) 1:200 y con el anticuerpo de fluoresceína anti-ratón isothiocyanate-conjugado con inmunoglobulina G. Se realizaron tres experimentos por separado y analizamos cada laminilla en el microscopio de epifluorescencia Axio Vert. A1 Carl Zeiss a 100 X en aceite de inmersión (Proquin et al., 2016).

6. Resultados

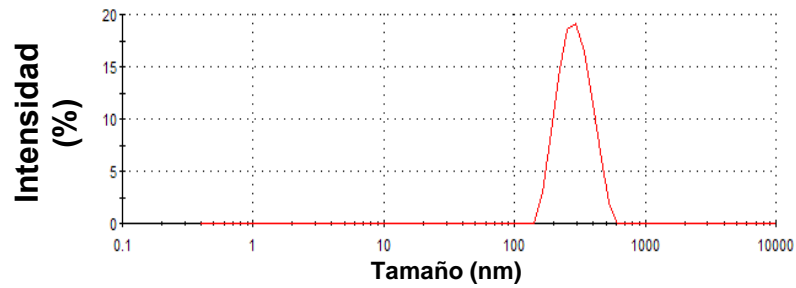
6.1 Caracterización de las partículas E171

Con el objetivo de saber las características fisicoquímicas de las partículas de E171 en nuestras condiciones de estudio, se determinó en peso seco mediante la técnica de SEM (Fig. 8 A) y la distribución de tamaños en agua potable mediante TEM (Fig.

8 B). El análisis de las partículas en peso seco demostró que hay partículas con tamaños mayores y menores a 100 nm, por otro lado la distribución de los tamaños en agua potable fue cercana a 100 nm, esto nos permitió corroborar, que sí estamos trabajando con una porción de partículas de tamaño nanométrico. La distribución general cuantitativa de tamaño de las partículas mediante el análisis con el Zsizer (aparato que analiza tamaño y forma de partícula) nos permitió conocer el rango de tamaños que presenta este nanomaterial que se encuentra comercialmente como un polvo. Con respecto a la estabilidad de las partículas en el medio acuoso se determinó el potencial Z (mide la estabilidad de las partículas cuando están suspendidas en un medio acuoso, potenciales cercanos a +30y -30 se consideran estables, por lo que no se precipitan) (Fig. 8 C). El tamaño de las partículas analizadas con Zsizer fue de 150 nm a 800 nm y presentaron un potencial Z de -30m a pH 7 del agua (Fig. 8D), este resultado nos permitió determinar su estabilidad en agua.



C Índice de polidispersión de las E171



D Equilibrio electroquímico de las E171

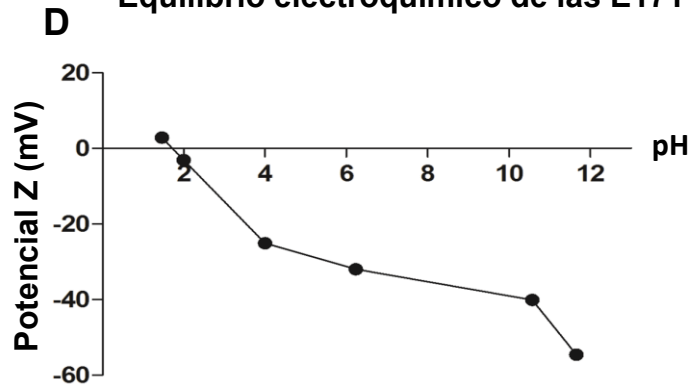


Fig. 8. Caracterización fisicoquímica de las partículas E171. Se muestra en la Fig. A) tamaño peso seco microscopía electrónica de barrido (SEM), B) en agua potable microscopía electrónica de transmisión (TEM), D) el índice de polidispersión de las partículas y D) potencial Z en donde el eje Y grafica los milivolts y el eje X el Ph.

6.2 Consumo de peso agua y alimento

El seguimiento del peso de los ratones, tuvo la finalidad de analizar si tanto el tratamiento con AOM/DSS como con las partículas de E171 alteraban fisiológicamente a los ratones. Con respecto al peso de los ratones se observó una tendencia de disminución de peso en los grupos CCR y CCR+E171 (Fig. 9), mostrando de esta forma que la combinación de los tratamientos podría alterar fisiológicamente a dicho grupo de ratones. Se monitoreó el consumo de alimento y agua con la intención de saber si el tratamiento con AOM/DSS alteraba estos parámetros. Se observa una tendencia de menor consumo de alimento en el grupo de CCR+E171 que se relaciona a la disminución de peso del mismo grupo, esto nos indica indirectamente el deterioro físico de los ratones a los 72 días del experimento. El consumo de agua no fue alterado por la presencia de DSS en los grupos CCR y CCR+E171 (Fig. 9).

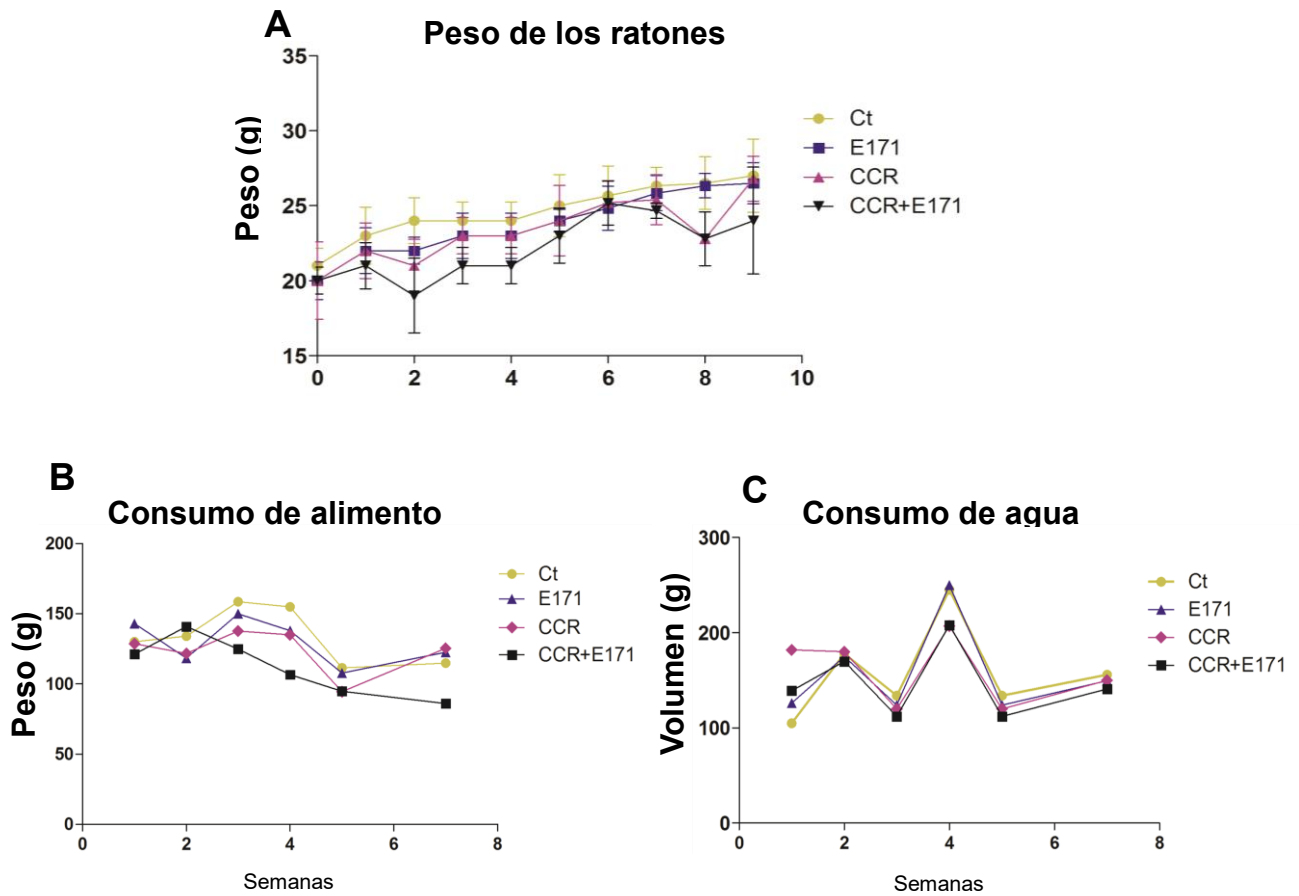


Fig. 9. Monitoreo de comportamiento habitual de los ratones posterior al tratamiento con AOM/DSS y E171. A) Peso de los ratones posterior a los tratamientos de E171 y AOM/DSS. B) consumo de alimentos y C) consumo de agua.

6.3 Inducción de secreción perianal por exposición a AOM/DSS y E171

A lo largo del experimento encontramos que los ratones que bebieron DSS, después de cada ciclo secretaban material purulento además de cuadros de diarrea con sangre. Los ratones que no recibieron tratamiento no presentaron ningún tipo de secreción (Fig.10 A). Los ratones expuestos intragástricamente a E171 presentaron sangrado leve a lo largo del experimento (Fig. 10 B). El cuadro de diarrea del grupo CCR fue el más severo, acompañado de secreción de sangre y material purulento (Fig. 10 C). El grupo CCR+E171 presentó los síntomas del grupo CCR además de protrusión anal (Fig. 1 D). Estos resultados nos indican la presencia de procesos inflamatorios provocado tanto por el AOM y DSS como por las partículas de E171.

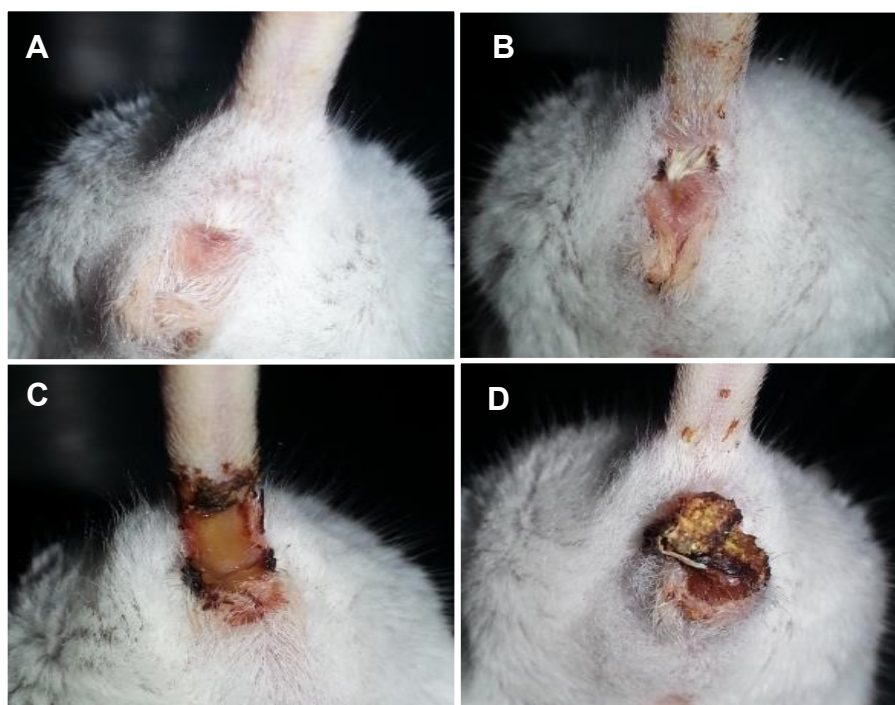


Fig. 10. Secreción de sangre, material purulento y protrusión anal por administración intragástrica de E171. A) Grupo de ratones Ct. B) grupo de ratones expuestos a durante 7 días E171 C) grupo de ratones con inducción de CCR y D) grupo de ratones CCR+E171.

6.4 Número de tumores en colon

El análisis de los colones disectados nos permitió saber si el tratamiento de partículas inducía tumores. El colon de los ratones del grupo CCR presentó en promedio 5 ± 1.2 tumores en la parte distal del colon. El grupo CCR+E171 tuvo un mayor número de tumores con un promedio de 20.2 ± 3.9 (Fig. 11 A y B). En este último grupo los tumores se distribuyeron de la parte distal a la parte media y fueron más pequeños que los tumores del grupo de CCR.

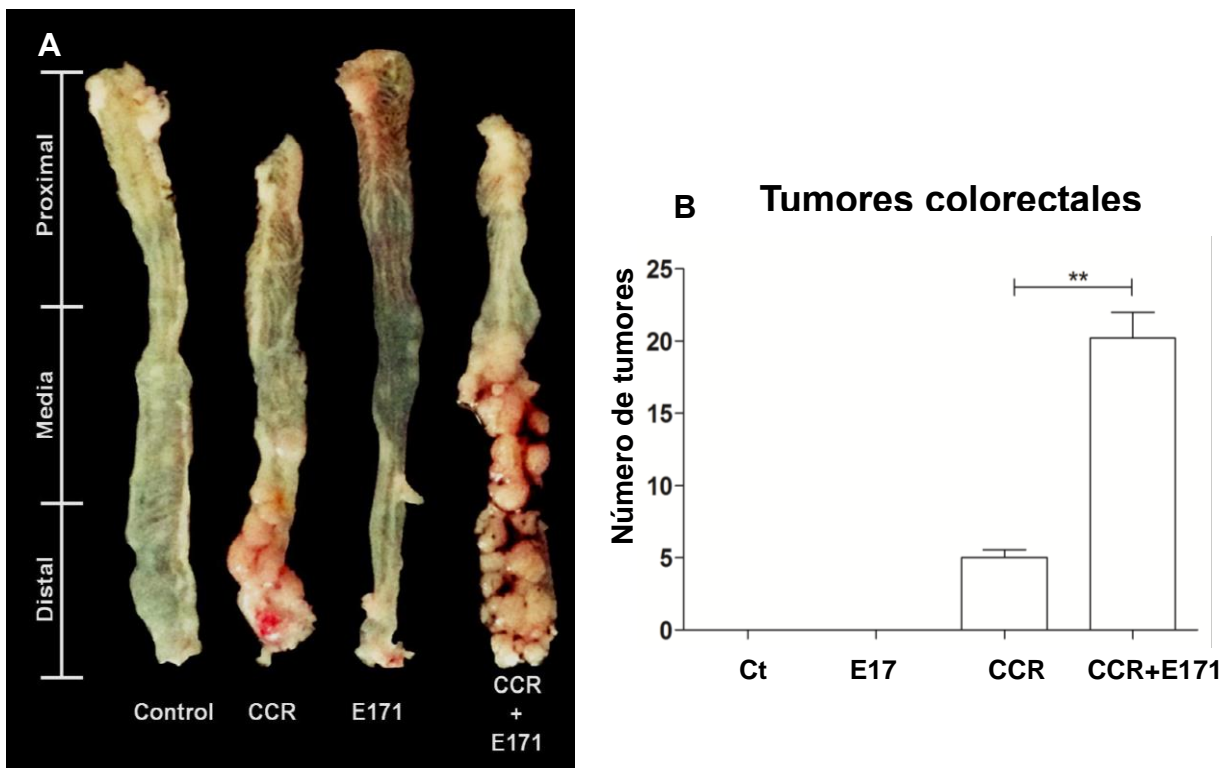


Fig. 11. Incremento de números de tumores en colon de ratones. A) Imagen representativa de presencia tumores en el colon de los ratones B) Número de tumores.

6.5 Determinación histológica de progresión tumoral por exposición intragástrica a E171

El deterioro de la morfología de las criptas nos permite saber la los estadios de desarrollo tumoral y de esta forma saber cuáles grupos presentaron tumores más desarrollados. El análisis histológico mostró que la morfología de las criptas de los ratones Ct fue normal, se encuentran alineadas una después de la otra conformando una capa mucosa sana, no presentó anomalías ni en el acomodo de las criptas ni en la forma (Fig. 12 A). Histológicamente el colon de los ratones tratados intragástricamente con 5mg/kg de E171, presentó alteraciones morfológicas en las criptas, en comparación con las los ratones Ct, la morfología de las criptas de los ratones E171 presentaron forma circular sin abertura hacia la luz del colon (Fig. 12 B), mientras que las criptas del grupo Ct tienen morfología de una invaginación de forma oval alargada con una abertura hacia la luz del colon. El colon de los ratones con CCR+E171 también presentó alteración en el alineamiento de las criptas, perdió la continuidad de unión con su cripta adyacente. El colon de los ratones con CCR, presentó alteraciones en la morfología de las criptas, todas perdieron su morfología normal y desaparecieron en su mayoría (Fig. 12 C). El colon de los ratones con CCR presentó mayor grosor y pérdida de la morfología de la capa mucosa. Esta morfología encontrada en estos ratones, es característica de adenomas con presencia de alto grado de displasia e hiperplasia. El colon de los ratones CCR+E171, presentó pérdida completa de la morfología de la mucosa, con pérdida completa de las criptas (Fig. 12 D). La morfología del adenoma de este grupo es característica de un adenocarcinoma tubular, con alto nivel de displasia. Histológicamente los adenocarcinomas de este grupo presentaron mayor grado de displasia que los del grupo con CCR, indicando un mayor grado de displasia por la exposición a E171.

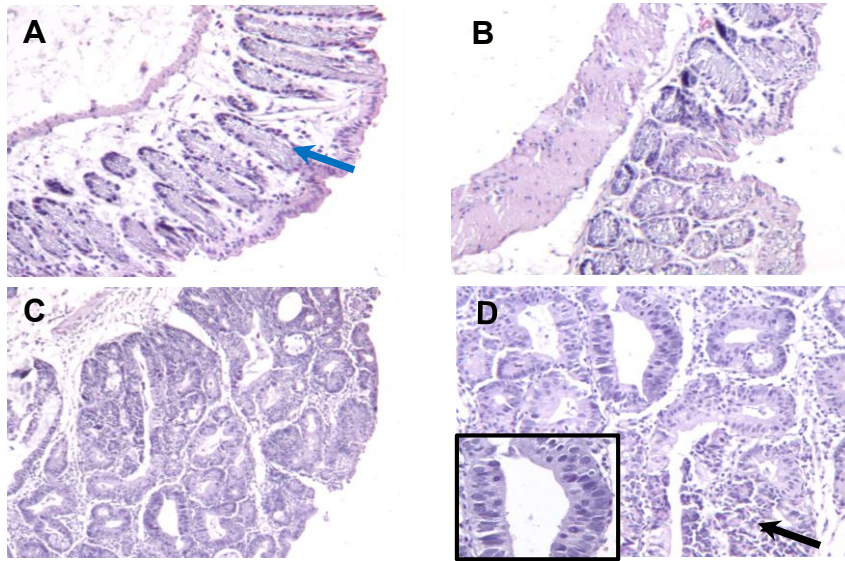


Fig. 12. Cortes histológicos de colon y tinción con H&E. De izquierda a derecha: A) Ct, criptas sanas B), grupo E171 con alteraciones en la morfología en las criptas del colon, C), grupo CCR adenocarcinoma colorectal estadio I y D) grupo CCR+E171 adenocarcinoma colorectal estadio III.

6.6 Evaluación del grado de progresión tumoral mediante los marcadores: Ki67, COX-2 y β -catenina.

Los marcadores de progresión tumoral que se emplearon en este trabajo se han utilizado ampliamente en el estudio del desarrollo de diferentes tipos de cánceres. Las inmunofluorescencias para los marcadores de progresión tumoral Ki67, COX-2 y β -catenina (Figs. 13, 14, 15 y 16) en cortes histológicos de colon, presentaron un patrón de expresión similar para todos los grupos. El grupo CCR+ presentó mayor intensidad de fluorescencia (n=6) en los tres marcadores de progresión tumoral, mostrando que los tumores de los ratones se encuentra en estadios más avanzados de la tumorigénesis. El grupo E171 fue positivo para los tres marcadores, pero presentó menor intensidad que los grupos CCR y CCR+E171: Este resultado es congruente con las alteraciones encontradas en la tinción con H&E, donde encontramos alteraciones morfológicas de las criptas. La marca positiva para Ki67

indica incremento de células en proliferación ya que es una proteína que se expresa en los núcleos durante la mitosis (Figs. 13 A y 14) y la marca positiva para β -catenina indica presencia de criptas aberrantes (Fig. 16). El incremento en COX2 indica el incremento de procesos inflamatorios. Las inmunofluorescencias de los tres marcadores en el grupo CCR fueron menos intensas que el CCR+E171, pero presentaron mayor intensidad que la marca de los grupos Ct y E171. El grupo Ct presentó una marca fluorescente basal para los tres anticuerpos.

En resumen estos resultados nos indican que los tumores más avanzados estuvieron presentes en el grupo CCR+E171, seguido del grupo CCR, el grupo E171 aunque no desarrollo tumores presento expresión de los marcadores y el grupo Ct presento una expresión basal de los mismos.

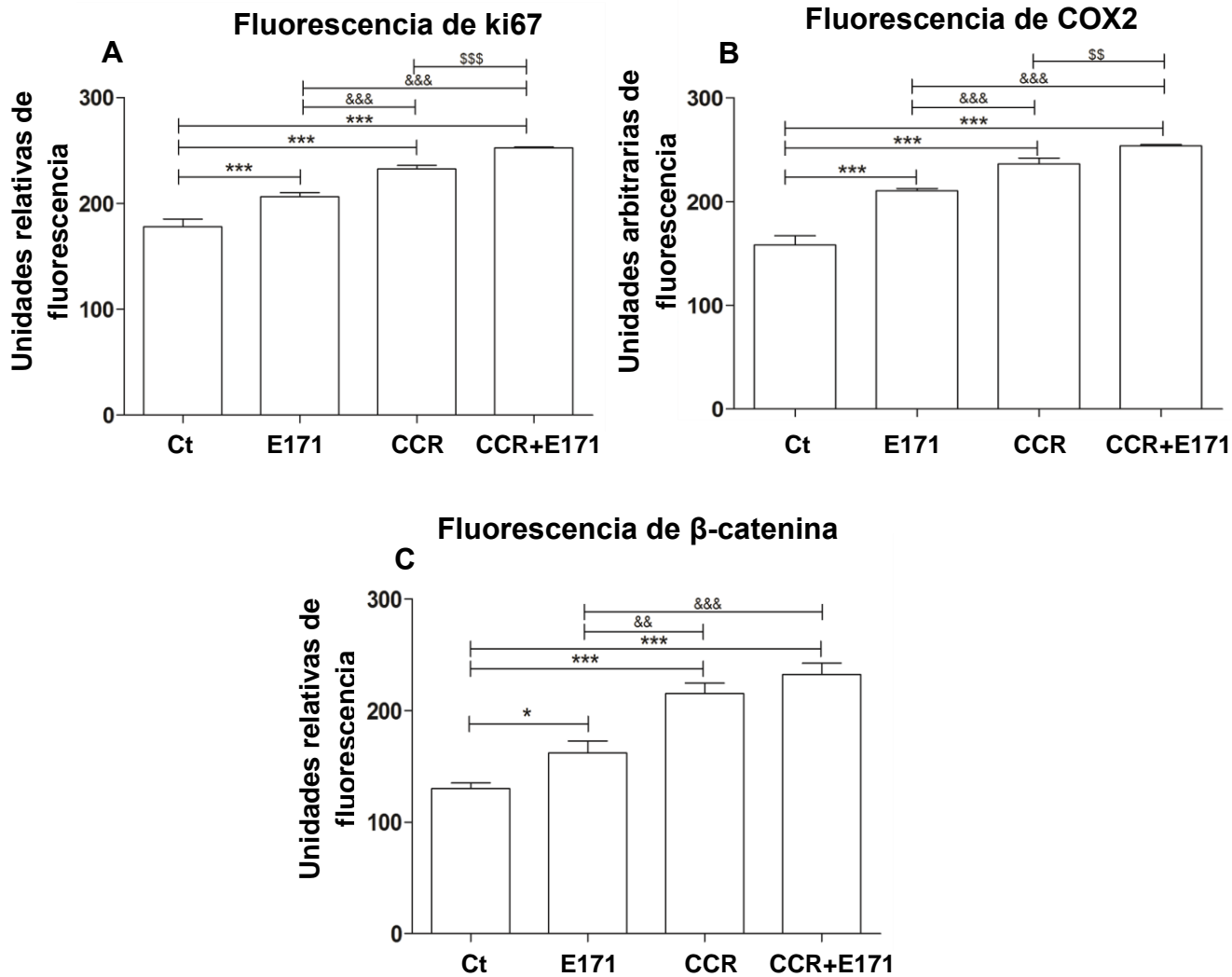


Fig. 13. Incremento de la expresión de marcadores de carcinogénesis cuando los ratones fueron expuestos a nanopartículas de E171. Intensidad relativa de fluorescencia de los marcadores de progresión tumoral A) ki67*** $p \leq 0.001$ vs Ct, B) marcador COX2 y*** $p \leq 0.001$ C), β -catenina * $p \leq 0.05$ vs Ct, n=6.

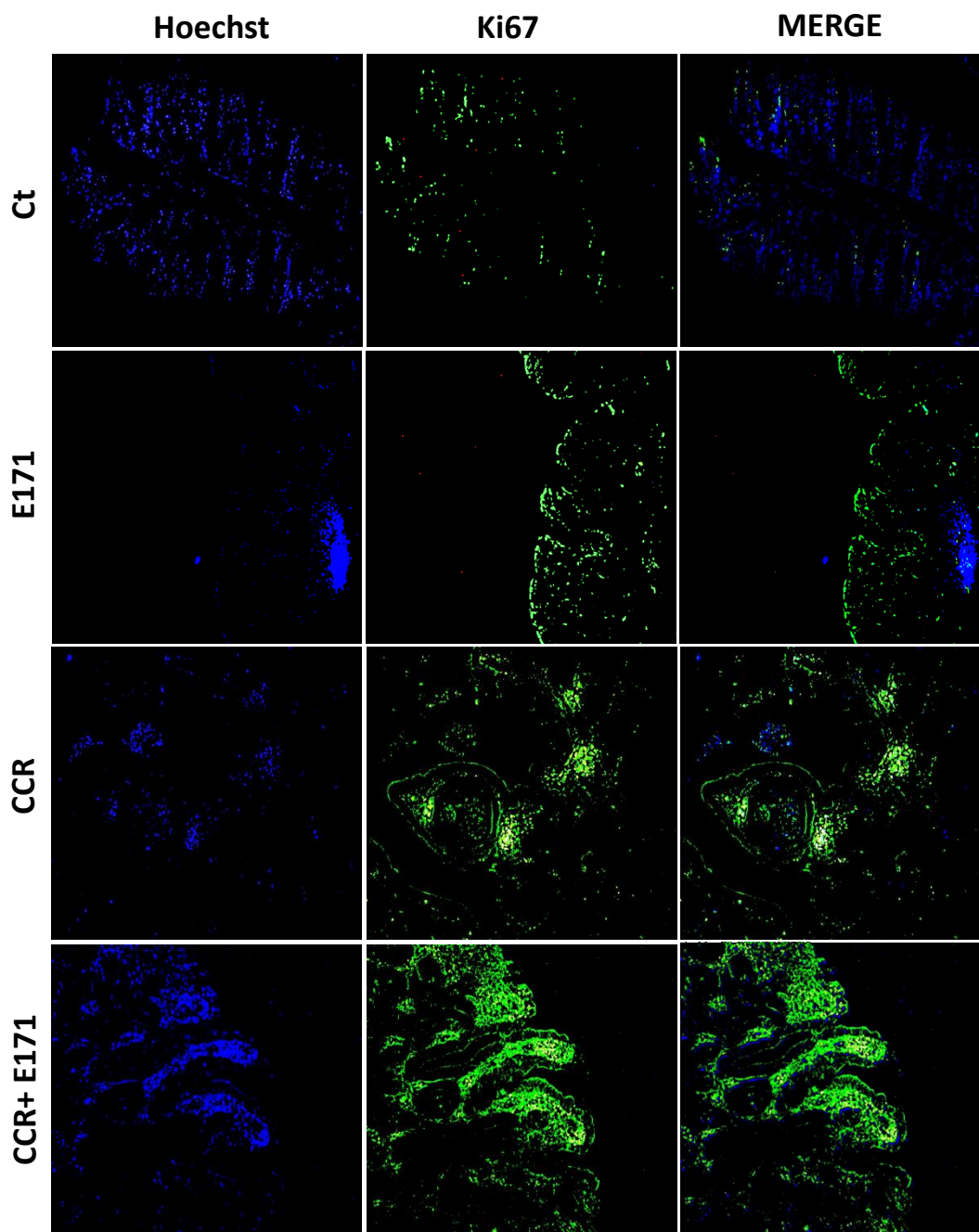


Fig. 14. Detección de la proteína Ki67 mediante inmunofluorescencia. En azul núcleos teñidos con hoechst y en verde la expresión de la proteína ki67.

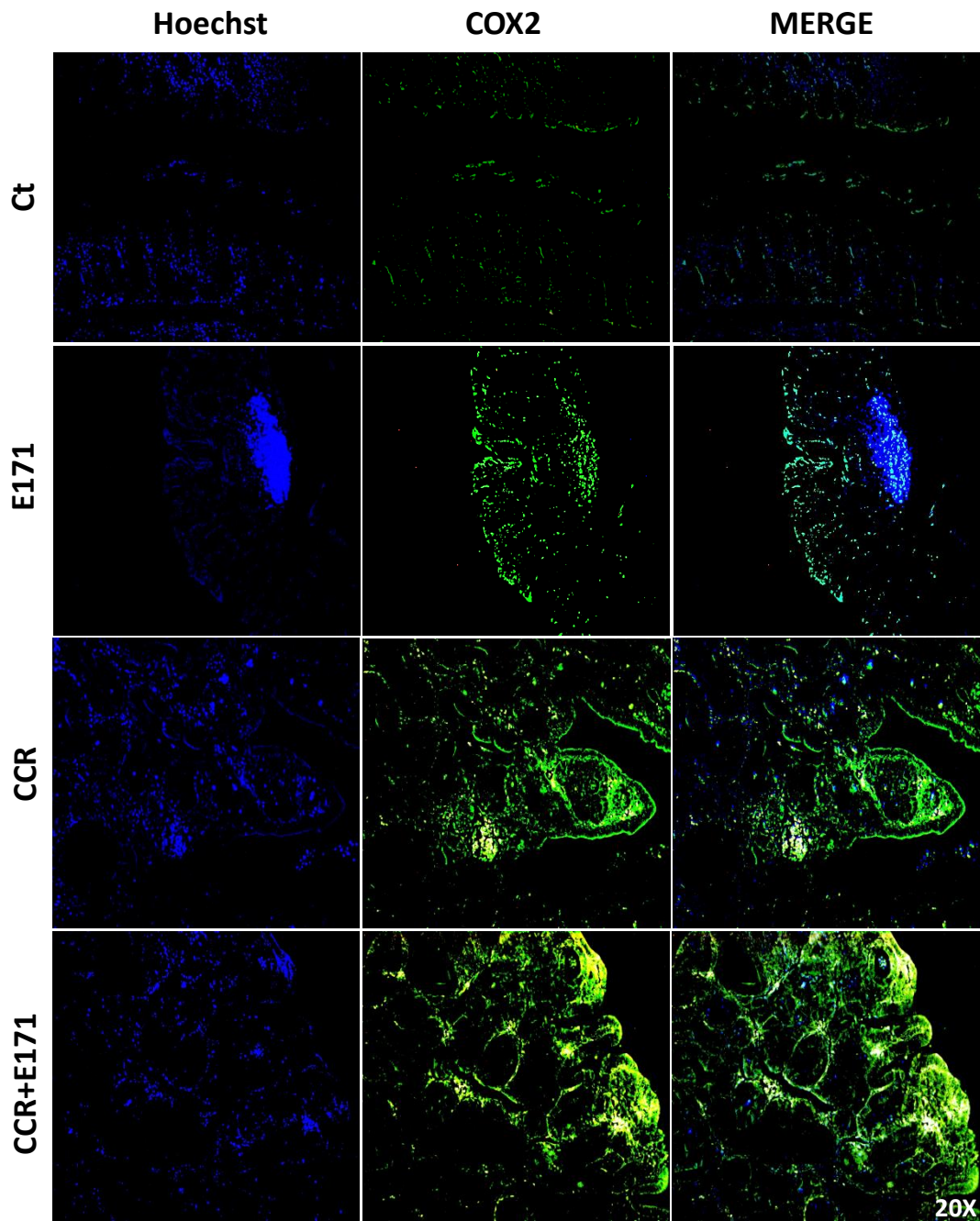


Fig. 15. Análisis de la expresión de COX2 mediante inmunofluorescencia. En azul núcleos teñidos con el colorante hoechst y en verde la expresión de la proteína COX2.

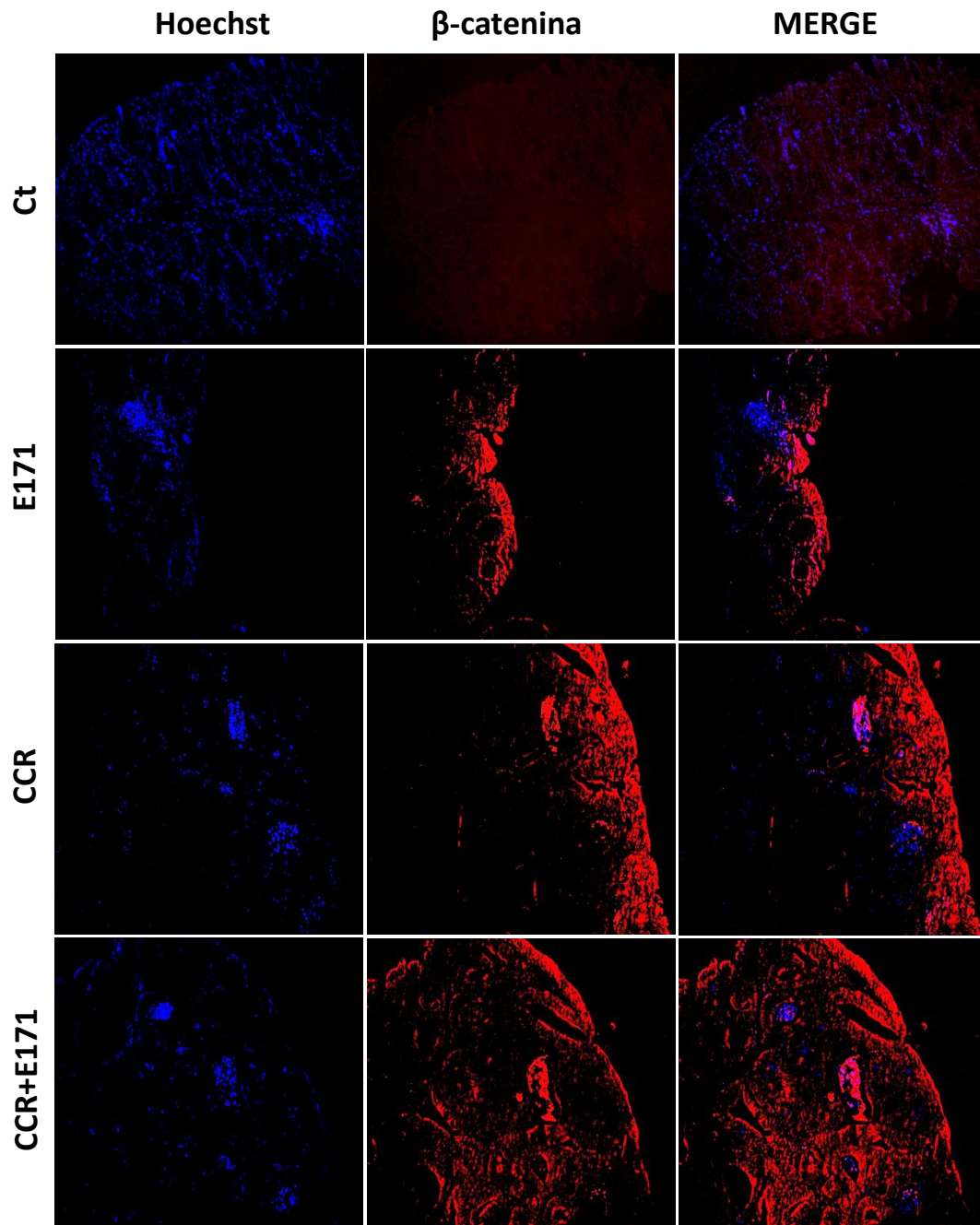


Fig. 16. Detección de la proteína β -catenina mediante inmunofluorescencia. En azul núcleos teñidos con dapi, en rojo la expresión de la proteína β -catenina.

6.7 Disminución del número de células caliciformes en el colon

El número de células caliciformes es una forma indirecta de analizar alteraciones en el tejido del colon, su desaparición indican procesos tumorigénicos. El grupo control conserva la arquitectura sana del colon y no hubo pérdida de estas. Los grupos E171, CCR y CCR+E171 tuvieron una notable pérdida de células caliciformes, 95.5%, 65.5% y 86.8% significativamente con respecto al control (Fig. 17). Estos resultados muestran que tanto los tratamientos con carcinógenos como las partículas de E171 promueven la pérdida de células caliciformes, lo que probablemente induce procesos carcinogénicos.

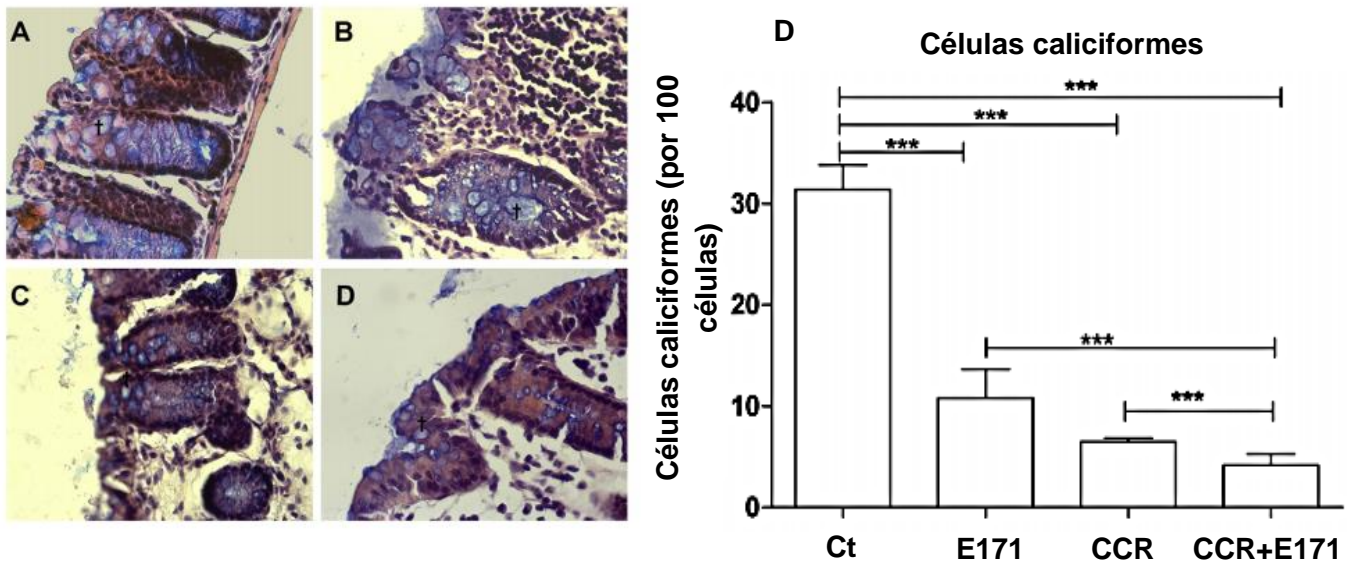


Fig. 17. Reducción de células caliciformes en tejido de colon. Grupos A) Ct, B) E171, C) CCR y D) CCR+E171. El grupo CCR+E171 presentó mayor pérdida de células caliciformes que el grupo E171. Las barras representan la media \pm desviación estándar * $p \leq 0.01$ vs Ct; n=6.

6.8 Determinación de interleucinas en tejido colorectal

Con la finalidad de entender si la formación de tumores estaba relacionada con procesos inflamatorios, medimos la expresión de interleucinas proinflamatorias IL-2, TNF- α e INF- γ , además medimos las interleucinas antiinflamatorias IL-10 y GM-CSF en el tejido colorectal de los ratones. Los resultados muestran un decremento decrecieron hasta un 51% la expresión de IL-2 en el grupo CCR+E171 vs el grupo E171 (*p<0.05; Tabla 1). También encontramos un decremento del 53%, 61% y 65% TNF- α (*p<0.05 vs Ct), INF- γ y IL-10 respectivamente en el grupo de CCR+E171 (*p<0.05 vs Ct; #p<0.05 vs E171; Tabla 1). Estos resultados sugieren que el grupo CCR+E171 presentó un decremento total del sistema inmune ya que decrecieron todas las interleucinas medidas excepto GM-Cs.

TABLA 1. Detección de interleucinas en tejido colorectal de ratón

	Ct	E171	CCR	CCR+E171	
IL-2 (pg/mL)	30±10	33±7	21±5	16±5*	*p<0.05 vs E171
TNF-α (pg/mL)	58±25	58±27	40±6	27±9*	*p<0.05 vs Ct
INF-γ (pg/mL)	47±14	49±28#	28±7	18±6**	*p<0.05 vs Ct; #p<0.05 vs E171
IL-10 (pg/mL)	26±10*	27±6#	13±12	9±4**	*p<0.05 vs Ct; #p<0.05 vs E171
GM-CSF (pg/mL)	35±6	38±11	25±5	22.5	

6.9 La exposición intragástrica a E171 alteró el peso de los riñones de los ratones

Con la finalidad de determinar cambios fisiológicos en otros órganos realizamos histología y pesamos los siguientes órganos: Riñones, bazo, hígado y pulmones. La exposición intragástrica a E171 indujo el decremento del 74% del peso de los riñones (* $p \leq 0.01$; Fig. 18). El peso del bazo y de los pulmones permanecieron sin cambios sin embargo presentaron una leve tendencia a decrecer en el grupo CCR+E171 (Fig.18B C y D). Sin embargo no se presentaron alteraciones histológicas ni se encontró presencia de urea o creatinina en el suero.

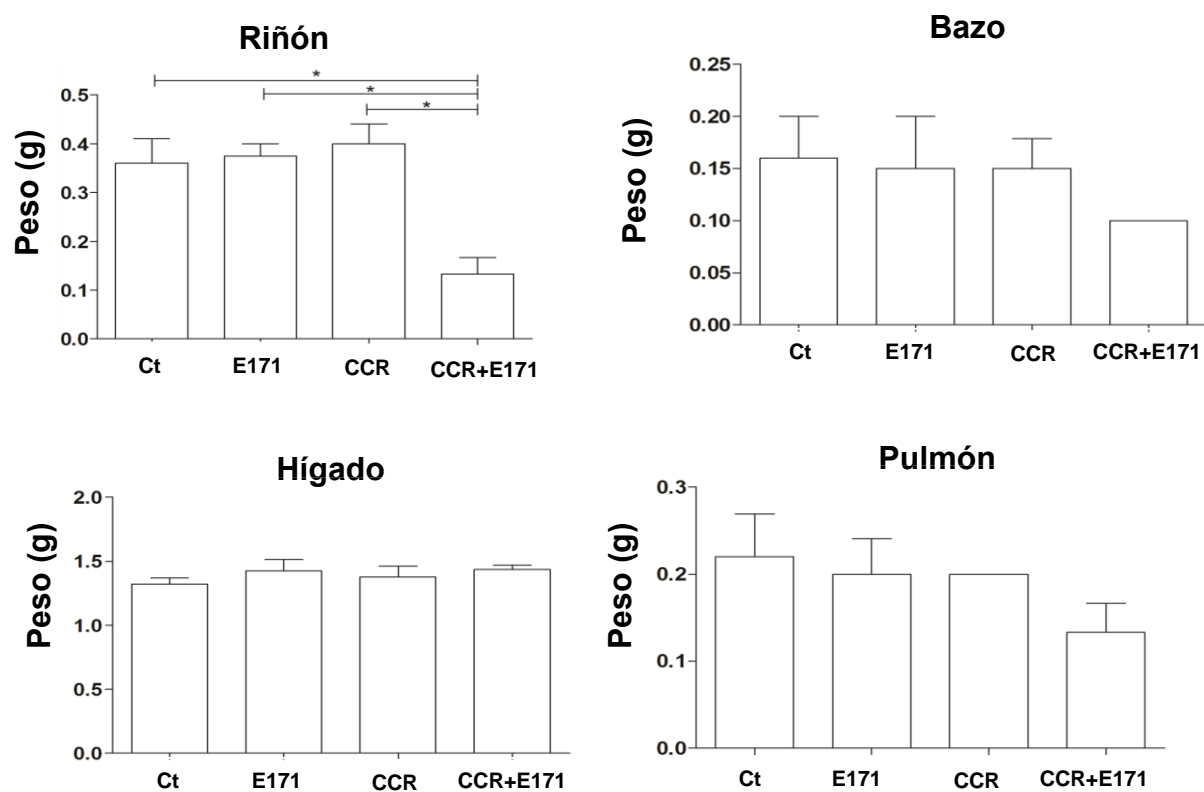


Fig. 18. Decremento del peso de los riñones por exposición intragástrica a E171. Peso de A) riñones, B) bazo C) hígado and D) pulmones después de 72 días de tratamiento con E171. CCR+E171 vs Ct

6.10 El cultivo primario de colon internalizó las partículas de E171

Se ha reportado la internalización de las partículas de E171 en cultivos celulares, por esta razón decidimos realizar cultivo primario de células de colon para determinar si en nuestro modelo in vivo ocurre dicho suceso. Los resultados muestran que los grupos que no recibieron tratamientos con E171 no presentaron internalización de las partículas (Fig. 19 A y C). Las células derivadas de los grupos E171 y CCR+E171 presentaron internalización de partículas de E171 (Fig. 19 B y D). El grupo E171 presentó partículas de E171 asociadas a la envoltura nuclear que se representan con flechas blancas y círculos blancos. El grupo de CCR+E171 presentaron partículas de E171 dentro del núcleo pero no asociadas a la envoltura nuclear, también encontramos E171 asociado al citoplasma, retículo endoplásmico y mitocondria.

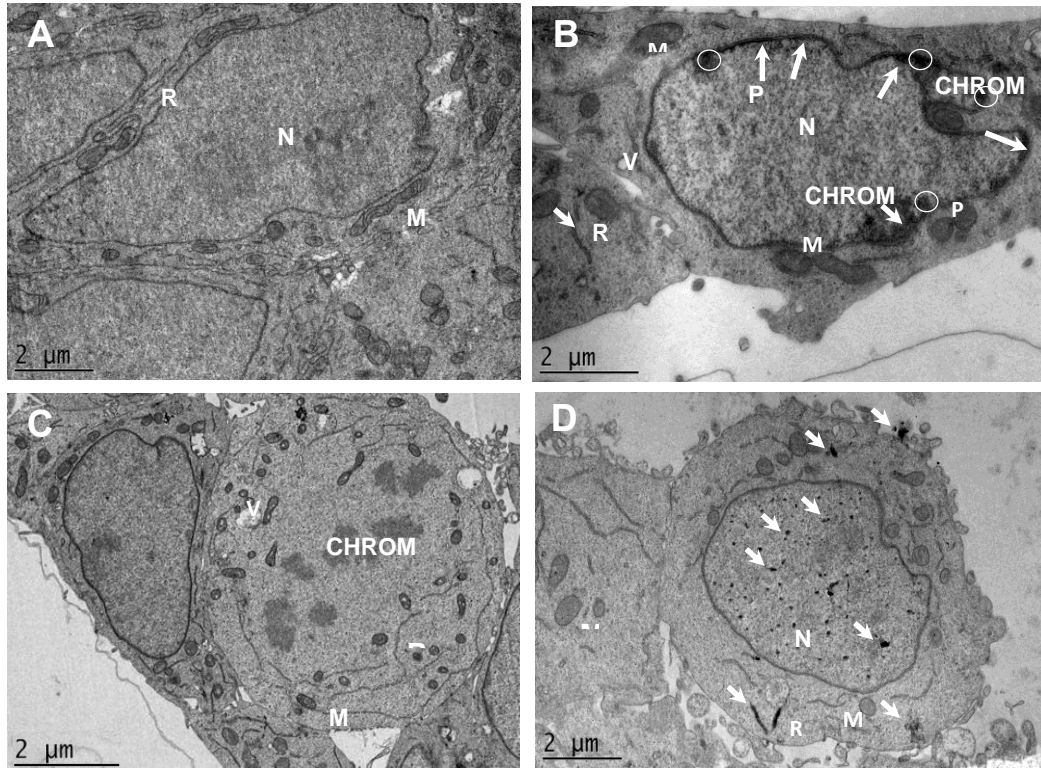


Fig. 19. Las partículas de E171 fueron internalizadas por el cultivo primario de E171. Las imágenes representativas de cultivo primario de colon de ratones analizadas por microscopía electrónica de transmisión muestran (A) células sin partículas, (B) células con E171 internalizadas en el núcleo, (C) células derivadas del grupo CCR (D) células del grupo CCR+E171 con partículas de E171 internalizadas. Las flechas y los círculos blancos señalan las partículas asociadas a la cromatina y envoltura nuclear. Núcleo (N), cromatina (CROM EN AL FIGURA TIENES CHROM, mitocondria (M), retículo (R) y vesículas (V). Imagen representativa.

Modelo in vitro

6.11 Las partículas de E171 fueron internalizadas por las células HCT116

La tinción de H&E nos permitió evaluar la morfología de las células, sin embargo también nos permitió observar la acumulación de las partículas dentro de la células. Principalmente se acumularon en el citoplasma, sin embargo también se acumularon en los núcleos (Fig. 20).

Internalización de partículas E171 por células HCT116

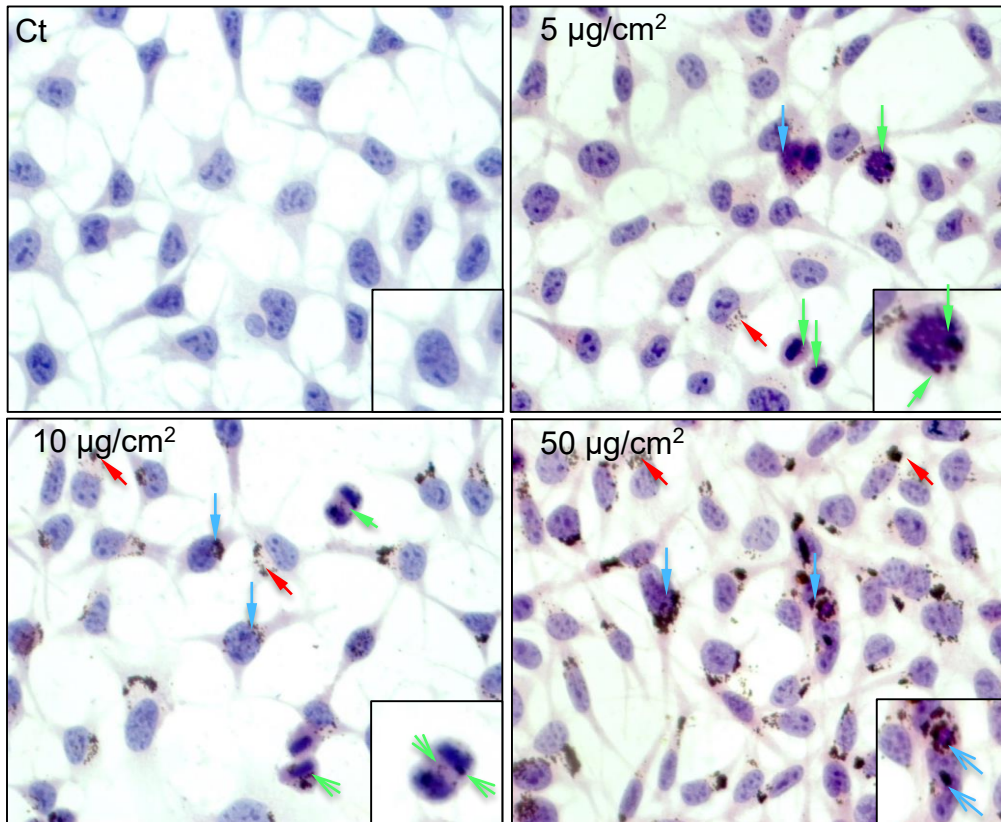


Fig. 20. Acumulación de partículas E171 en células HCT116, tinción con H&E. Las células epiteliales de colon acumularon partículas de E171 en el citoplasma (flechas rojas) y en los núcleos (flechas azules). Células en mitosis acumularon partículas en los cromosomas (flechas verdes).

6.12 Las partículas de E171 no alteran la viabilidad de células HCT116

Con la finalidad de evaluar los efectos citotóxicos de las partículas E171, se evaluó la viabilidad de células HCT116 expuestas durante 24 h a 0, 5, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171 (Fig. 21). Los resultados muestran que las células HCT116 expuestas a dichas concentraciones no presentan disminución en la viabilidad.

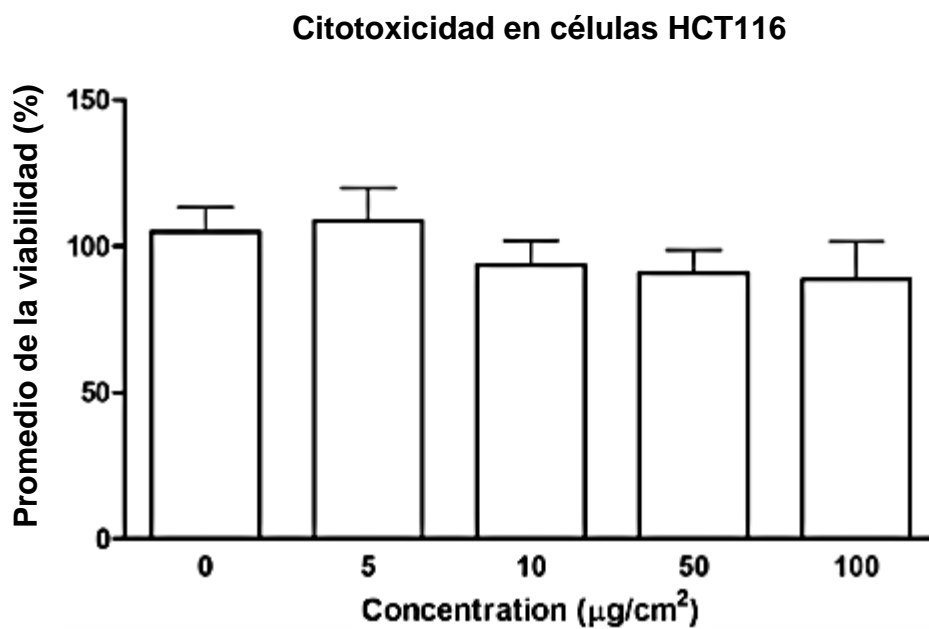


Fig. 21. Citotoxicidad en células HCT116 a 24 h de exposición a E171. No se encontraron diferencias significativas en la viabilidad de las células HCT116.

6.13 Las partículas de E171 promueven la pérdida de material genómico

Para corroborar si las partículas de E171 inducían daño genotóxico, utilizamos células HCT116 con estabilidad cromosómica y realizamos la técnica de MNs a concentraciones no citotóxicas de E171. La exposición a E171 promovió la aparición de MNs partir de la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, el incremento de MNs fue directamente proporcional al incremento de la concentración de E171. Con este resultado podemos concluir que las partículas de E171 promueven la pérdida de material genético en forma de MNs.

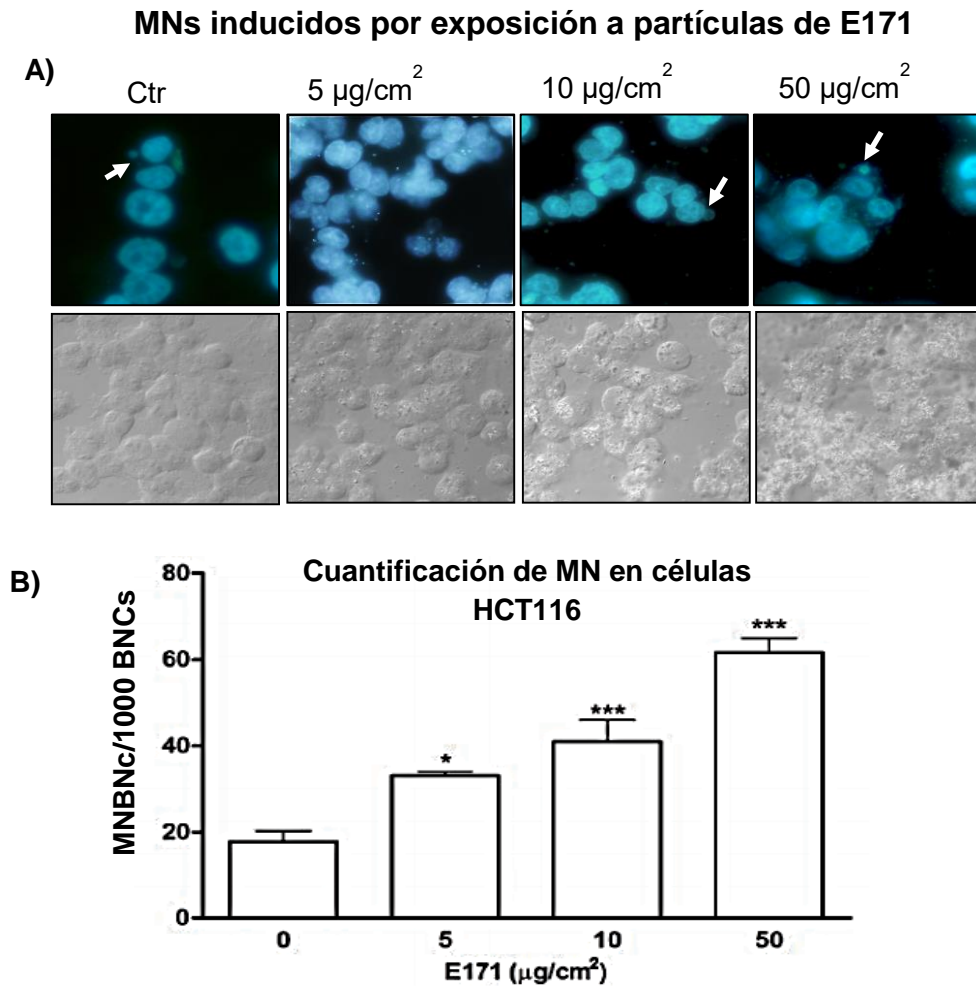


Fig. 22 Incremento de MNs en células binucleadas (BNCs) . A) Imágenes de células con presencia de MNs **B)** Cuantificación de MNs presentes en 1000 células binucleadas.

6.14 Las partículas de E171 se acumulan principalmente en los polos del huso mitótico

Para corroborar indirectamente cómo es que las partículas de E171 están induciendo la formación de MNs. Nos planteamos la hipótesis de que el E171 promueve alteraciones en la maquinaria de segregación de los cromosomas, por lo que nos dimos a la tarea de buscar células en metafase de la mitosis y observar si las partículas interactúan con los microtúbulos de los husos mitóticos. Se utilizaron concentraciones no tóxicas de E171 (0, 5, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y mediante microscopía de epifluorescencia, analizamos la co-localización de las partículas de E171 (campo claro) con las regiones polares de los husos mitóticos que fueron marcados con el anticuerpo α -tubulina. Además se observa co-localización del ADN- α -tubulina-partículas E171 (Fig. 23 flecha roja). Los resultados muestran que en todas las concentraciones las partículas de E171 se acumulan en los polos de las células mitóticas e interactuaron con los microtúbulos de las células en mitosis, así como con el DNA.

Las partículas de E171 se acumulan en los polos de los husos mitóticos

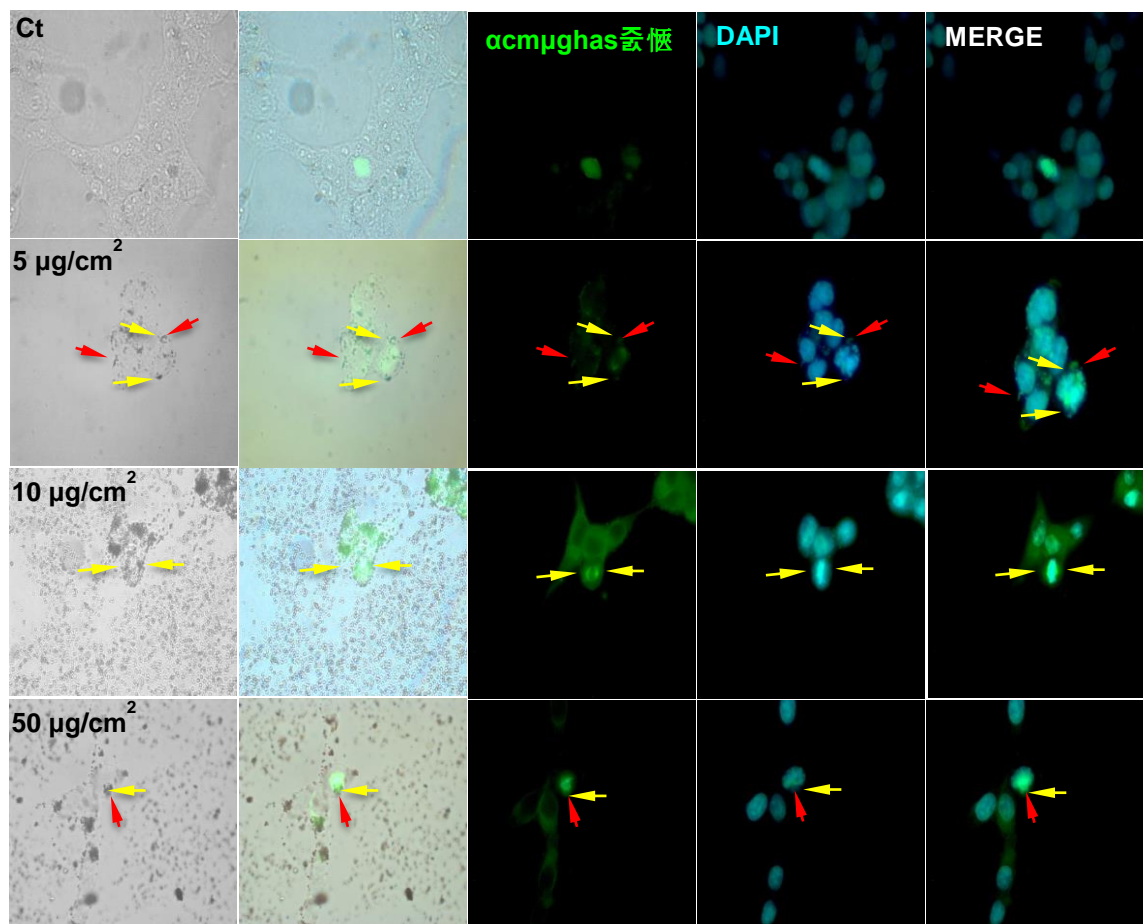


Fig. 23. Interacción de las partículas de E171 con los polos del huso mitótico. Las células epiteliales de colon HCT116 presentaron acumulación de E171 en los polos de los husos (flechas amarillas). Además se observa la interacción de las partículas con la tubulina y ADN (flechas rojas).

7 Discusión

7.1 Análisis del modelo murino y desarrollo de los tumores

Las investigaciones con modelos murinos estudian la distribución de las NPs-TiO₂ en el sistema gastrointestinal cuando éstas son ingeridas. Para esta finalidad en diferentes trabajos administraron las NPs-TiO₂ por vía oral, para evaluar los órganos donde las NPs-TiO₂ pueden depositarse. Los trabajos concluyen que las NPs-TiO₂ se internalizan por los coloncitos (Wang et al., 2013) y se depositan en la mucosa del intestino delgado, colon e hígado (Onishchenko et al., 2012 y Wang et al., 2007). En el presente trabajo, debido a los antecedentes anteriores asumimos que las E171 pueden depositarse en el colon, y generar algún tipo de alteración en el epitelio que conlleve a la predisposición o aparición de CCR. La dosis utilizada en el presente trabajo administrada vía intragástrica de E171 durante 10 semanas (5mg/kg/día), potenció la cantidad de tumores cuando fue administrada en ratones con CCR. Cuando las E171 se administraron en ratones a los que no se les indujo CCR, no se observaron tumores colorectales, pero se encontró vascularización anormal en la zona distal del colon, lo que significa que las E171 podrían haber inducido alteraciones que podrían inducir tumores después de las 10 semanas de exposición. Una evidencia de que las E171 podrían estar induciendo procesos carcinogénicos, es que cuando se administraron en combinación con AOM/DSS potencian la aparición de más tumores, esto significa que de alguna forma las E171 promueven alteraciones que inducen la aparición de tumores.

Una de las alternativas para la inducción de tumores es que las E171 debido a sus propiedades fisicoquímicas, pudieran estar promoviendo un ambiente inflamatorio propicio para la acumulación de mutaciones, por ejemplo un ambiente oxidante que esté promoviendo mutaciones puntuales o rompimientos de doble cadena en

protooncogenes o genes supresores de tumor que conlleven a la inducción de procesos carcinogénicos y como consecuencia a la formación de tumores.

El modelo de CCR inducido con AOM/DSS es un modelo utilizado para estudiar la inducción de CCR asociado a colitis ulcerativa, que es un tipo de enfermedad inflamatoria del intestino (EII). En la presente investigación se encontró que la administración intragástrica de E171, CCR el modelo animal nos permite suponer que las E171 podrían estar promoviendo la formación de tumores de una forma más rápida a los pacientes con algún tipo de EII. Se ha demostrado que las E171 pueden acumularse en las úlceras de pacientes con EII, por lo que es importante resaltar que el consumo de E171 en un futuro podría estar incrementando la incidencia de CCR en personas con EII (Schmidt et al., 2012).

7.2 Análisis histológico de los tumores

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 (Jen J. et al., 1994).

Los resultados muestran que las E171 aunque no son capaces de inducir tumores per se, a dosis de 5mg/kg en 10 semanas de exposición intragástrica, histológicamente sí muestran alteraciones en las criptas, estas alteraciones podrían ser similares a las propuestas por Stevens et al. 2007, quien reportó la pérdida de la estructura normal y de la posición, denominándolas como criptas aberrantes,

lesión que dará origen a un adenoma. En general se ha aceptado que la carcinogénesis de colon, es un proceso que comienza en una cripta colónica, y que la aparición de una cripta aberrante podría iniciar un proceso que dé lugar a un adenoma y posteriormente a un carcinoma (Tanaka et al., 2003).

Los ratones tratados con AOM/DSS, presentaron histológicamente un crecimiento adenomatoso con neoplasia tal como reportó Robertis et al. 2011. Morfológicamente fue un adenoma ligeramente diferenciado a adenocarcinoma tal y como reportó Tanaka T. et al. 2003. Nuestro tratamiento de CCR+E171 y CCR según la tinción con H&E presentó la aparición de adenomas diferenciados a adenocarcinomas con invasión en la mucosa.

La displasia de la mucosa colónica se describió por (Riddell et al., 1983 y Pascal 1994) La mucosa se caracteriza por presentar criptas ligeramente dilatadas con epitelio normal. En la displasia leve, los núcleos son alargados y pseudoestratificados con polaridad conservada y el número de células caliciformes es normal o ligeramente reducida. En la displasia moderada, hay mayor número de núcleos alargados con mayor pseudoestratificación, también se conserva la polaridad de las criptas pero disminuye el número de células caliciformes. En la displasia severa el núcleo es más grande de forma ovoide con un prominente nucléolo, se pierde la polaridad de la cripta e incrementa la cantidad de células mitóticas y presentan pérdida total de las células caliciformes. Con esta descripción podemos decir que los ratones tratados con E171, presentan displasia leve, los ratones con CCR presentan displasia severa y los CCR+E171 presentaron mayor grado de displasia.

7.3 Analisis sobre la expresión de β -catenina y su probable participación en la vía Wnt

La exposición intragástrica a E171 indujo alteraciones moleculares en las criptas del colon, posiblemente por daño en la vía de Wnt canónica, esta aseveración la podemos hacer debido a que encontramos la sobreexpresión de β -catenina en ambos grupos de ratones tratados intragástricamente con E171. La proteína β -catenina juega un papel importante en la regulación de la vía de Wnt, ya que esta proteína, cuando no se encuentra fosforilada en el citoplasma, se transloca al núcleo y funciona como un activador de los factores de transcripción C-myc, TCF y LEF, que regulan proliferación y diferenciación celular. Mutaciones en esta proteína, o alteraciones en la expresión de su gen, podrían evitar su captura por el complejo degradador y su posterior ubiquitinación y degradación, desregulando así, procesos de diferenciación y proliferación celular. En el grupo CCR+E171 se han reportado mutaciones de β -catenina, la han propuesto como un biomarcador de criptas aberrantes, que es una lesión precarcinogénica en colon que dará origen a un adenoma y posteriormente a un carcinoma.

El complejo secuestrador de β -catenina está conformado por GSK3 β (glucogemo sintetasa/cinasa) quien fosforila a β -catenina, para su degradación vía proteosoma, otras proteínas que conforman al complejo degradador de β -catenina son Axina, APC, DVL (disvella) por lo que mutaciones en estas proteínas inducen desregulación de esta vía.

APC es una proteína que forma parte del complejo secuestrador de β -catenina, APC presenta sitios de unión a β -catenina, si se inducen mutaciones en estos sitios de unión, entonces β -catenina se transloca todo el tiempo al núcleo, promoviendo así la proliferación celular. En el síndrome autosómico denominado como poliposis adenomatosa familiar, donde los individuos que la padecen presentan adenomas en el intestino delgado y grueso, es ocasionado por mutaciones germinales en un

alelo de APC Volgenstain & Fearon 1990 a partir de este descubrimiento se ha demostrado que la mayoría (85%) de esporádicos se deben a deleciones del locus 5p de APC, induciendo así un fenómeno de iniciación de CCR. La deleción de la región cromosómica 5p dará paso a la acumulación de otras mutaciones y deleciones, por ejemplo de K-ras y p53. Probablemente las E171 están interfiriendo con la segregación del locus de APC o promoviendo su pérdida, induciendo de esta forma la desregulación de β -catenina y como consecuencia de la vía de Wnt, pero además iniciando un proceso de CCR que se ya se ha descrito ampliamente.

7.4 Análisis del papel de COX-2 en el desarrollo de los tumores

La ciclooxigenasa-2 o COX-2 es una proteína citoplasmática que cataliza a partir de ácido araquidónico, la síntesis de prostaglandinas. Su expresión es elevada en sitios donde hay inflamación, aproximadamente hay expresión de COX-2 en el 80% de CCR y 40% en adenomas (Rerhart et al., 1994). En el presente trabajo encontramos mayor expresión de COX-2 en la mucosa de los ratones tratados con E171 por lo que podemos asumir que hay procesos que conllevan a inflamación o que hay activación de mecanismos que podrían llevar a carcinogénesis, ya que COX-2 se expresa en el epitelio colónico neoplásico, mientras que el epitelio normal es negativo a COX-2.

Se ha reportado que hay sobreexpresión de COX-2 en las células neoplásicas de ratones con CCR, esta sobreexpresión se ha relacionado a alteraciones de la proteína APC (Kim et al., 2012). Este fenómeno se ha observado en pacientes con poliposis adenomatosa familiar, donde alteraciones en APC promueven la sobreexpresión de COX-2, esto se debe a que la unión de APC con β -catenina atenúa la transcripción de COX-2 (Takahashi et al., 1998). Esta observación nos lleva a suponer que probablemente la sobre expresión de COX-2 en nuestros ensayos tanto en los grupos E171, y CCR+E1-71, se deba a alteraciones en APC,

probablemente esto se deba a que hay mutaciones que impiden su unión a β -catenina o puede deberse a la pérdida del locus 5p.

La presencia de COX-2 es importante en la progresión de los tumores colorectales. Se ha documentado muy bien su expresión de CCR esporádicos y en modelos como AOM/DSS (Ishikawa & Herschman 2010). Por esta razón podemos asumir que entre mayor marca de COX-2, mayor será la progresión del cáncer. En nuestros resultados encontramos que hay mayor expresión de COX-2 en los grupo E171, y CCR+E171 respectivamente, teniendo así mayor progresión de CCR en el grupo CCR y CCR+E171.

7.5 Análisis del papel de Ki67 en el desarrollo de los tumores

Ki-67 es una proteína presente en todas la células en proliferación y no en las células arrestadas, por esta razón su detección es utilizada para el diagnóstico de tumores y para la estimación de la fracción total de células que se están dividiendo (Endl & Gerdes 2000). Se ha demostrado que la presencia de la proteína de Ki-67 es necesaria para la fosforilación in-vitro de cdc2 que es una proteína importante en el punto de monitoreo de la fase G2-M del ciclo celular. En nuestros resultados existe una mayor intensidad de fluorescencia para el anticuerpo Ki-67 en la mucosa de los ratones expuestos a E171 que la mucosa de los ratones control. Es importante mencionar que nuestro trabajo coincide con Sycheva et al. 2011 que reportó mayor número de células colorrectales en mitosis después de exponer a ratones por vía oral a NPs-TiO₂, de esta forma podemos asumir que las E171 pueden estar induciendo la proliferación celular activando procesos de carcinogénesis. La exposición intragástrica de las E171 indujo mayor proliferación celular en los grupos E171 y CCR+E171, el grupo CCR debió de haber tenido más células en mitosis debido al efecto del AOM/DSS, pero presentó menor células mitóticas que el grupo CCR+E171.

7.6 Análisis del papel de las interleucinas en el desarrollo de los tumores

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 intragástricamente NPs de TiO₂, encontraron 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.

7.7 Análisis del posible mecanismo de inestabilidad genómica

Las partículas de E171 son internalizadas por las células HCT116, esta internalización permite la interacción de las partículas con las proteínas presentes en el citoplasma. Las proteínas que conforman el citoesqueleto son muy abundantes, la tubulina es una proteína de suma importancia para diferentes procesos celulares, por ejemplo en la mitosis esta proteína, es necesaria para la formación del huso mitótico y la correcta segregación de los cromosomas (Gonzalez L et al, 2010). La interacción de las partículas de E171 con la tubulina induce alteración en la estructura de los microtúbulos estas alteraciones pueden inducir daños en la segregación de los cromosomas. Se observó que las partículas

de E171 pueden interactuar con los polos del huso mitótico, en ese lugar se encuentran los centrosomas o también llamados centros organizadores de microtúbulos, donde se expresa la proteína γ -tubulina, alteraciones en dicha expresión conlleva a alteraciones en la progresión del ciclo celular y alteraciones en el arrastre de los cromosomas en la metafase de la mitosis. (German A. et al., 2013).

Por otro lado no se ha determinado el mecanismo de inducción de micronúcleos por la exposición a las partículas de E171, en este trabajo pretendemos determinar que la inducción de MNs se debe a las alteraciones de los microtúbulos, sin embargo con estos resultados no podemos asegurar que este sea el mecanismo. Es necesario determinar aún si la procedencia de los MNs se debe a rompimientos de doble cadena del ADN por un mecanismo independiente a las alteraciones en los microtúbulos, por incremento de estrés oxidativo (Fenech M. 2010). Para determinar su origen tenemos que realizar los experimentos de inmunodetección centrómeros en los MNs y análisis de alteraciones en el “check point” de la mitosis por ejemplo medir la expresión de los genes de las proteínas BubR1, BUB-1 y BUB-2, que se encargan de la estabilidad de la segregación cromosómica y alteraciones en estos lleva a inestabilidad cromosómica (Zhao Y et al., 2014).

8 Conclusiones

Modelo *in vivo*

- Las partículas presentaron un tamaño promedio de 200 nm y un índice de polidispersión a pH del agua de -23 mv.
- El peso de los ratones así como el consumo de agua y de alimento no fue alterado por el tratamiento de partículas de E171

- La administración intragástrica de aglomerados de 200 nm de E171 (5mg/kg) durante 10 semanas potenció la formación de tumores en el colon distal de ratones BALB/c adultos tratados con AOM/DSS.
- Los marcadores de progresión tumoral COX2, Ki67 y β -catenina demostraron que la exposición a E171 exacerbó la progresión tumoral en el colon de los ratones.
- Las partículas de E171 administradas en ratones a los que no se les indujo AOM/DSS no indujeron la formación de tumores pero presentaron alteraciones displásicas en el epitelio del colon así como decremento en del número de células caliciformes.
- El peso de los riñones disminuyó significativamente en el grupo de ratones E171+, los pulmones, el hígado y el bazo de este mismo grupo no presentaron alteraciones en el peso.
- Las citosinas IL-2, IL-10, INF- γ y TNF- α disminuyeron significativamente en el tejido del grupo de ratones E171+ CCR.
- Las partículas de E171 fueron internalizadas por las células del cultivo primario de los grupos de ratones E171 y CCR+E171, principalmente en el núcleo y citoplasma.

Modelo *in vitro*

- Las células HCT116 expuestas a partículas de E171, presentaron acumulación de las mismas en citoplasma y núcleo.
- La viabilidad de las células HCT116 no fue afectada por la exposición a partículas de E171 en concentraciones de 0, 5, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.
- Las células HCT116 expuestas a partículas de E171 presentaron daño genotóxico en forma de MNs, se encontraron mayor cantidad MNs en la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

- Las partículas de E171 se acumularon en los polos de los husos mitóticos de las células expuestas a 0, 5, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

8.1 Conclusión general

La exposición a partículas E171 vía intragástrica indujo alteraciones displásicas en el colon de ratones sanos y promovió el incremento de tumores colorectales en el grupo de ratones CCR+E171. Todos los grupos que recibieron tratamiento con partículas E171 sobre expresaron los marcadores tumorales Ki67, COX2 y β -catenina. Las partículas de E171 fueron internalizadas por los colonocitos de los ratones al igual que fueron internalizadas por las células HCT116, por esa razón asumimos que las alteraciones genómicas como incremento de MNs e interacción del E171 con los husos mitóticos de células HCT116 son los mecanismos de potenciamiento de aparición de tumores.

9. Referencias

Al-Lahham SH., Peppelenbosch MP., Roelofsen H., Vonk RJ., Venema K. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. (2010). *Biochimica et Biophysica Acta*; 18 (01); 1175-1183.

Alrawi SJ., Schiff M., Carroll RE., Dayton M., Gibbs JF., Kulavlat M., Tan D., Berman K., Stoler DL., Anderson GR. Aberrant crypt foci. (2006). *Anticancer Research*. 10:107-119.

Arthur J., Jobin C. The Struggle Within: Microbial Influences on Colorectal Cancer. (2011). *Inflammatory Bowel Diseases*. 17; 396-409.

Bergin I., Witzmann F. Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. (2013). *International journal of biomedical nanoscience and nanotechnology*. 3; 545-555.

Bevan S., Woodford-Richens K., Rozen P., Eng C., Young J., Dunlop M. Screening SMAD1, SMAD2, SMAD3, and SMAD5 for germline mutations in juvenile polyposis syndrome. (1999). *Gut*. 45; 406-408.

Bingham SA., Day NE., Luben R., Ferrari P., Slimani N., Norat T., Clavel-Chapelon F., Kesse E., Nieters A., Boeing H., Tjønneland A., Overvad K., Martinez C., Dorransoro M., Gonzalez CA., Key TJ., Trichopoulou A., Naska A., Vineis P., Tumino R., Krogh V., Bueno-de-Mesquita HB., Peeters PH., Berglund G., Hallmans G., Lund E., Skeie G., Kaaks R., Riboli E. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. (2003). *Lancet*. 361; 1496-1501.

Birkett A., Muir J., Phillips J., Jones G., O'Dea K. Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans. (1996). *The American Journal of Clinical Nutrition*; 63; 766-772.

Boyle P. & Levin, B. *World Cancer Report* (2008). IARC Press. Lyon.

Boyle T., Fritschi L., Heyworth J. y Bull F. Long-term sedentary work and the risk of subsite-specific colorectal cancer. (2011). *American Journal of Epidemiology*. 173; 1183-1191.

Candela M., Turrioni S., Biagi E., Carbonero F., Rampelli S., Fiorentini C., Brigidi P. Inflammation and colorectal cancer when microbiota-host mutualism breaks. (2014). *World Journal Gastroenterology*. 20; 908-922.

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

Cunningham JM., Christensen ER., Tester DJ., Kim CY., Roche PC., Burgart LJ., Thibodeau SN. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. (1998). *Cancer Research*. 58; 3455-3460.

Davis CD., Milner JA. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. (2009). *Journal Nutrition Biochemistry*. 20; 743-752.

<http://www.ccohs.ca/headlines/text186.html>
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/CurrentPreamble.pdf>

Chan A., Giovannucci E. Primary Prevention of Colorectal Cancer. (2010). *Gastroenterology*. 138); 2029-2043.

De Robertis M., Massi E., Poeta ML., Carotti S., Morini S., Cecchetelli L., Signori E., Fazio VM. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. (2011). *Journal of Carcinogenesis*. 24; 10-19.

Dunford R., Salinaro A., Cai L., Serpone N., Horikoshi S., Hidaka H., Knowland J. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. (1997). *FEBS Letters*. 418; 87-90.

Durko L., Malecka-Panas E. Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer. (2014). *Current Colorectal Cancer Reports*. 10; 45-54.

Endl E., Gerdes J. Posttranslational modifications of the KI-67 protein coincide with two major checkpoints during mitosis. (2000). *Journal of Cellular Physiology*. 182 (3); 371-380.

Fearon ER., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis (1990). *Cell*. 1 (61); 759-767.

Fenech M. The in vitro micronucleus technique. (2000). *Mutation Research*. 455; 81-95.
Fenech M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. (2010). *Health Physiology*. 98(2):234-43.

Freyre-Fonseca V., Delgado-Buenrostro NL., Gutiérrez-Cirlos EB., Calderón-Torres CM., Cabellos-Avelar T., Sánchez-Pérez Y., Pinzón E., Torres I., Molina-Jijón E., Zazueta C., Pedraza-Chaverri J., García-Cuéllar CM., Chirino YI. Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. (2011). *Toxicology Letters*. 202 (2); 1111-1119.

Fodde R., Kuipers J., Rosenberg C., Smits R., Kielman M., Gaspar C., van Es JH., Breukel C., Wiegant J., Giles RH., Clevers H. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability (2001). *Nature Cell Biology*; 3: 433-438.

German A. Pihan. 2013. Centrosome Dysfunction Contributes to Chromosome Instability. *Frontier of Oncology*. 3: 277.

Gheshlaghi ZN., Riazi GH., Ahmadian S., Ghafari M., Mahinpour R. Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. (2011). *Acta Biochimica et biophysica*. 40; 777-782.

Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. (2001). *The Journal of Nutrition*. 131; 3109-3120.

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 Weijenberg M. Dietary heme iron and the risk of colorectal cancer with specific mutations in KRAS and APC. (2013). *Carcinogenesis*. 34; 2757-2766.

Gonzalez L., Decordier I., Kirsch-Volders M. Induction of chromosome malsegregation by nanomaterials. (2010). *Biochemical Society Transaction*. 38(6):1691-7.

Grady WM. Genomic instability and colon cancer. (2004). *Cancer Metastasis Reviews*. 23:11-27.

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. Molecular mechanism of kidney injury of mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles. (2011). *Journal of Hazardous Materials*. 195; 365-370.

Gurr JR., Wang AS., Chen CH., Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. (2005). *Toxicology*. 213; 66-73.

Hagland HR, Berg M, Jolma IW, Carlsen A, Søreide K. Molecular pathways and cellular metabolism in colorectal cancer. (2013). *Digestive Surgery*. 30 (1);12-25.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. (2011). *Cell*. 144(5); 646-674.

Hajj Hussein IA., Tohme R., Barada K., Mostafa MH., Freund JN., Jurjus RA., Karam W., Jurjus A. Inflammatory bowel disease in rats: bacterial and chemical interaction. (2008). *World Journal Gastroenterology*. 14; 4028-4039.

Hara R., Greenman J., MacDonald A., Gaskell K., Topping K., Duthie G., Kerin M., Lee P. y Monson J.. Advanced colorectal cancer is associated with impaired interleukin 12 and enhanced interleukin 10 production. (1998). *Clinical Cancer Research*. 4; 1943-1948.

Hebels D.. Toxicogenomic responses to N-nitroso compound exposure in relation to human colorectal cancer risk. (2010). Nederland, Maastricht. University of Maastricht.

Huang S., Chueh PJ., Lin YW., Shih TS., Chuang SM. Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO₂ long-term exposure. (2009). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 241; 182-194.

Hughes LA., Khalid-de Bakker CA., Smits KM., van den Brandt PA., Jonkers D., Ahuja N., Herman JG., Weijnenberg MP., van Engeland M. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: progress and problems. (2012). *the world's leading*

platform for high quality peer-reviewed full-text *journals*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1825 (1); 77-85.

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: carbon black, titanium dioxide, and talc. Vol. 93. Lyon, France: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. Publication (2010). [<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol93/ndex.php>].

Ishikawa TO., Herschman HR. Tumor formation in a mouse model of colitis-associated colon cancer does not require COX-1 or COX-2 expression. (2010). *Carcinogenesis*. 31; 729-36.

Jani P., Halbert G., Langridge J. y Florence T. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. (1990). *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 42; 821-826.

Jass JR., Whitehall VL., Young J., Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. (2002). *Gastroenterology*. 123; 862-76.

Jen J., Powell S., Papadopoulos N., Smith K., Hamilton S., Vogelstein B. y Kinzler K. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. (1994). *Cancer Research*. 54; 5523-5526.

Kaemmerer E., Klaus C., Kyung-Jeon M., Gassler N., Molecular classification of colorectal carcinomas: The genotype-to-phenotype relation. *World journal Gastroenterology*. 19 (45); 8163-8167.

Kim E., Coelho D., Blachier F. Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. (2013). *Nutrition Research*. 33; 983-994.

Kim YS., Deng GR. Epigenetic changes (aberrant DNA methylation) in colorectal neoplasia. (2007). *Gut and Liver*. 1; 1-11.

Kraus S., Arber N. Inflammation and colorectal cancer. (2009). *Current Opinion in Pharmacology*. 9; 405-410.

Kim HS., Kundu JK., Le JS., Oh TY., Na HK., Surh YJ. Chemopreventive effects of the standardized extract (DA-9601) of *Artemisia asiatica* on azoxymethane-initiated and dextran sulfate sodium-promoted mouse colon carcinogenesis. (2012). *Nutritional Cancer*. 60; 90-97.

Kuhnle GG., Bingham SA. Dietary meat, endogenous nitrosation and colorectal cancer. (2007). *Biochemical Society*. 35; 1355-1357.

Leggett B., Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. (2010). *Gastroenterology*. 138; 2088-2100.

Lakatos P., Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: Changes, causes and management strategies. (2008). *World Journal of Gastroenterology*. 14; 3937-3944.

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.. Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. (2010). *Toxicology Letters*. 195; 161-168.

Lee S., Kim M. Cytokines in Cancer Immunotherapy. (2011). *Cancers*. 3; 3856-3893.

Lengauer C., Kinzler KW., Vogelstein B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*. 396, 643-9.

Leslie A., Carey FA., Pratt NR., Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. (2002). *British Journal of Surgery*. 89; 845-60.

Lingle WL., Barret SL., Negron VC., D'Assoro A B., Boeneman K., Liu W., Whitehead CM., Reynolds C. Salisbury JL. Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. (2002). Proceedings of the National Academy of Sciences U S A. 99; 1978-1983.

López-Savedra A., Herrera LA. The role of alternative mRNA splicing in chromosome instability. (2010). Mutation Research. 705; 246-251.

Lomer MC., Hutchinson C., Volkert S., Greenfield SM., Catterall A., Thompson RP., Powell JJ. Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and subjects and patients with Crohn's. (2004). British journal of nutrition. 92 (6); 947-955.

Lu P., Ho I., Lee T. Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by titanium dioxide in Chinese hamster ovary-K1 cells. (1998). Mutant Reserch. 414; 15-20.

Lunn JC., Kuhnle G., Mai V., Frankenfeld C., Shuker DE., GlenRC. The effect of haemin red and processed meat on the endogenous formation of N-nitroso compounds in the upper gastrointestinal tract. (2007). Carcinogenesis. 28;685-90.

Margiotta G., Sanfilippo A., Accardo FM., Damiani P., Geraci A., Tomasello G. Chronic Inflammatory Bowel Disease in patients with orthopedic manifestation. Comparison with the data reported in international literauture. (2012). Euromediterranean Biomedical Journal. 7; 33-38.

Matsumoto H., Takata R. Komeiji. D.. Synthesis of the Glucuronic Acid Conjugate of Methylazoxymethanol. (1979). Cancer Research. 39; 3070-3073.

Muleris M., Delattre O., Olshwang S., Dultrillaux AM., Remvikos Y., Salmos RJ., Thomas G., Dulltrilaux. Cytogenetic and molecular approaches of polyploidization in colorectal cancer adenocarcinomas. (1990). *Cancer genetics cytogenetics*. 44; 107-108.

Morgan G., Silva A. y Sat D. Colorectal risk factors. (2008). *Gaceta Mexicana de Oncología*. 7; 12-15.

Neufert C., Becker C., Neurath M. An Inducible Mouse Model Of Colon Carcinogenesis For The Analysis Of Sporadic And Inflammation-Driven Tumor Progression. *Nature Publishing*. 2; 1998-2004.

Ni J., Chen S., Hollander D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. (1996). *Gut*. 39; 234-241.

NIOSH Current intelligence bulletin 60: interim guidance for medical screening and hazard surveillance for workers potentially exposed to engineered nanoparticles. By Schulte PS, Trout D, Zumwalde RD. Cincinnati, OH: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health, DHHS (NIOSH) Publication 2011.

Ochiai M., Watanabe M., Nakanishi M., Taguchi A., Sugimura T. y Nakagama H. Differential staining of dysplastic aberrant crypt foci in the colon facilitates prediction of carcinogenic potentials of chemicals in rats. (2005). *Cancer Letters*. 220; 67-74.

Onishchenko GE., Erokhina MV., Abramchuk SS., Shaitan KV., Raspopov RV., Smirnova VV., Vasilevskaya LS., Gmoshinski IV., Kirpichnikov MP., Tutelyan VA. Effects of titanium dioxide nanoparticles on small intestinal mucosa in rats. (2012). *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 154 (2); 265-270.

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. 296; 850-859.

Pascal. RR. Dysplasia and early carcinoma in inflammatory bowel disease and colorectal adenomas. (1994). Human Pathology. 25; 1160-71.

Parkin DM. International variation. (2004). Oncogene. 23; 6329-40.

Pericleous M., Mandair D. y Caplin M.. Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. (2013). The Journal of Gastrointestinal Oncology. 4; 409-423.

Perse M., Cerar A. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. (2012). Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012; 2-13.

Pihan GA., Purohit A., Wallace J., Malhotra R., Liotta., Doxsey, S. J. Centrosome defects can account for cellular or genetic changes that characterize. (2001). Cancer research. 61; 2212-2219.

Proquin H., Rodríguez-Ibarra C., Moonen C., Urrutia-Ortega IM., Bridé JJ., de Kok TM., van Loveren H and Chirino YI. Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. (2016). MUTAGE. (00), 1-11.

Rajagopalan H., Lengauer C., Aneuploidy and cancer. (2004). Nature. 432: 338-341.

Raskov H., Pommergaard HC., Burcharth J., Rosenberg J. Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. (2014). World Journal Gastroenterology. 20 (48); 18151-18164.

Rerhart. CE., Coffey RJ., Radhika A., Giardiello FM., Ferrenbach S., DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. (1994). *Gastroenterology*. 107; 1183-1188.

Richard G., Stevens HS., Daniel. WR. Epidemiology of Colonic Aberrant Crypt. (2007). *Cancer Letters*. 252 (2); 171-183.

Riddell RH., Goldman H., Ransohoff DF., Appelman HD., Fenoglio CM., Haggitt RC. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. (1983). *Human Pathology*. 14;931-968.

Rodríguez-Paredes M., Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. (2011). 17 (3); 330-339.

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.. Sedentary behavior is 75 associated with colorectal adenoma recurrence in men. (2014). *Cancer Causes Control*. Epub ahead of print.

Schmidt C., Lautenschlaeger C., Collnot EM., Schumann M., Bojarski C., Schulzke JD., Lehr CM., Stallmach., A. Nano- and microscaled particles for drug targeting to inflamed intestinal mucosa-A first in vivo study in human patients. (2013). *Journal Control Release*. 165(2):139-4.

Shing H., Pin JC., Yun-Wei L., Tung-Sheng S., Show-Mei C. Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO₂ long-term exposure. (2009). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 241; 182-194.

Shvachko LP. DNA hypomethylation as Achilles' heel of tumorigenesis: a working hypothesis. (2009). Cellular Bioogy. 33; 904-10.

Skocaj M., Filipic M., Petkovic J., Novak S. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? (2011). Radiology Oncology. 45; 227-247.

Solomon L., Mansor S., Mallon P., Donnelly E., Hoper M., Loughrey M., Kirk S. y Gardiner K. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. (2010). Comparative Clinical Pathology. 19; 235-239.

Soon S., Emerich S., Requeijo S., Weisburger J. y Gonzalez F. Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. (2001) Cancer Research. 61; 8435-8440.

Sycheva LP., Zhurkov VS., Iurchenko VV., Daugel-Dauge NO., Kovalenko MA., Krivtsova EK., Durnev AD. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo. (2011). Mutation Reserch. 726; 8-14.

Thaker AI., Shaker A., Rao MS., Ciorba MA. Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). (2012). Journal of Visualized Experiment. <http://www.jove.com/video/4100/modeling-colitis-associated-cancer-with-azoxymethane-aom-dextran>.

Takahashi M., Fukuda K., Sugimura T., Wakabayashi K. Beta-catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. Cancer Research. (1998). 58; 42-46.

Takayama T., Ohi M., Hayashi T., Miyanishi K., Nobuoka A., Nakajima T. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. (2001). *Gastroenterology*. 121; 599-611.

Tanaka T., Kohno H., Suzuki R., Yamada Y., Sugie S., Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. (2003). *Cancer Science*. 94; 965-973.

Terzić J., Grivennikov S., Karin E., Karin M. Inflammation and colon cancer. (2010) *Gastroenterology*. 138; 2101-2114.

Thompson SL., Bakhoun SF., Compton DA. Mechanisms of chromosomal instability. (2010). *Current BiolMar*. 20(6); 285-295.

Tomasello G, Tralongo P, Damiani P, Sinagra E, Di Trapani B, Zeenny MN, Hajj Hussein I, Jurjus A, Leone A. Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: Changes in response of colocytes. (2014). *World J Gastroenterol*. 28(48); 18121-18130.

Viguera E., Canceill D., Ehrlich SD. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. (2001). *The European Molecular Biology Organization journal*. 20; 2587-2595.

Villela MG., Urive-Silva MA., Muñoz SD. Clorectal risk factors. (2008). *Instituto Nacional de Cancerología*. 7; (4).

Vincent TL., & Gatenby RA. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. (2008) *International Journal of Oncology*. 32, 729-37.

Vogelstein B., Fearon ER., Hamilton SR., Kern SE., Preisinger AC., Leppert M Genetic alterations during colorectal-tumor development. (1988). *The New England Journal of Medicine*. 319; 525-532.

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. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. (2007). *Toxicological Letters*. 168; 176-185.

Wang JJ., Sanderson BJ., Wang H. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. (2007). *Mutation Research* 628; 99-106.

Wang Y., Chen Z., Ba T., Pu J., Chen T., Song Y., Gu Y., Qian Q., Xu Y., Xiang K., Wang H., Jia G. Susceptibility of Young and Adult Rats to the Oral Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles. (2013). *Small head*. 9(10); 1742-1752.

Weir A., Westerhoff P., Fabricius L., Hristovski K., von Goetz N. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. (2013). *Environmental Science & Technology*. 46; 2242-2250.

Wimmer K., Kratz CP., Vasen HF., Caron O., Colas C., Entz- Werle N., Gerdes AM., Goldberg Y., Ilencikova D., Muleris M., Duval A., Lavoine N., Ruiz-Ponte C., Slavic I., Burkhardt B., Brugieres L. Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium 'care for CMMRD' (C4CMMRD). (2014). *Journal of Medical Genetics*. 51(6); 355-365.

World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer 2011. Available from: URL: <http://www.aicr.org/reduceyour-cancer-risk/recommendations-for-cancer-prevention/>

Zhao Y., Ando K., Oki E., Ikawa-Yoshida A., Ida S., Kimura Y., Saeki H., Kitao H., Morita M., Maehara Y. 2014. Aberrations of BUBR1 and TP53 gene mutually associated with chromosomal instability in human colorectal cancer. *Anticancer Research*. 34 (10): 5421-7.

10. Agradecimientos

Este trabajo de tesis está dedicada principalmente a mi familia. A mis padres que fueron los pilares para que pudiera concluir esta etapa: Sara Ortega Cabrera e Ismael Urrutia Sánchez, mis hermanas Sarahi Urrutia Ortega y Sharon Urrutia Ortega. A mi sobrina Odeth Urrutia Ortega. Agradezco todo el apoyo brindado para llegar a este punto de mi vida y por compartir con todos ellos este éxito el más importante hasta ahora en mi vida. Agradezco a Dios por permitirme ser parte de esta familia que amo y por llegar a este momento de mi vida con ellos, todos juntos. *“Gracias familia por esforzarse en educarme y por darme todo lo que necesario para llegar a este punto de mi vida, sin ustedes no hubiera existido”.*

Agradezco especialmente a la Dra. Yolanda Irasema Chirino López, por todo el apoyo y asesoría que recibí para la elaboración de este trabajo, sin ella no hubiera sido posible terminar este trabajo. En este párrafo hago alusión a la gran admiración que siento por su persona y el profundo respeto que siento al ser humano que veo en ella. Agradezco todos los momentos de consejos, de regaños y los momentos de felicidad.

“Le agradezco Dra Irasema todo el tiempo que se tomó en formarme, por la confianza que me tuvo desde que me conoció, me disculpo por todos los disgustos que le hice pasar, al final del día todo lo que me dijo tenía razón. La quiero mucho

y siempre va a tener un lugar especial en mi corazón y en mi pensamiento, gracias por el gran ejemplo de vida que me ha dado”.

A la Dra Norma Laura Delgado Buenrostro: Muchas gracias Dra, por todo el apoyo moral y técnico. “La mayoría de las cosas que aprendí en el laboratorio las aprendí de usted. Gracias por la paciencia y por haberme enseñado todo lo que sé”.

A mis compañeros de laboratorio: Al “colon team”; A Carolina Rodriguez Ibarra y a Luis Guillermo Garduño; Gracias amigos porque por ustedes este trabajo salió de la mejor forma. Gracias porque además de ser mis compañeros fueron mis amigos en las buenas y en las malas. *“Los quiero mucho amigos y siempre contarán conmigo en la vida, para cualquier cosa que necesiten siempre contaré con ustedes”.* A Ingrid una gran amiga y gran ejemplo de dedicación y de búsqueda de sueños. *“Gracias amiga por compartir tantas hora de trabajo de laboratorio y gracias sobre todo por la amistad. Te quiero y admiro”.* Para Alejandro Désiga; mi compañero desde primer semestre de la carrera de biología; *“Te quiero mucho amigo, gracias por estar ahí conmigo en las buenas y en las malas, por siempre escucharme”.* A Veronica Freyre *“Gracias amiga por todo el apoyo moral e intelectual que me brindaste desde que llegué al laboratorio”.* A mis otros compañeros; Octavio, Nataly, Melisa y Kevin *“Gracias a todos ustedes por compartir tiempo conmigo en el laboratorio y porque aprendí muchas cosas de ustedes”.* Gracias infinitas a todo.

Por último agradezco a mi compañera cósmica Karime García Guzmán y a Tatari. Por ser parte de mi manada. Karime; *“Gracias por estar ahí siempre preocupándote por mí, por la confianza que me diste, por abrir las puertas de tu casa, por el amor que recibí de tu parte y por esos días que pude amanecer a tu lado. Por ser mi compañera espiritual, por todos los sueños compartidos, gracias por mostrarme el verdadero significado del amor. Gracias por todo, te amo”.* Tatari; *“Gracias por*

acompañarme, porque tu mirada es la mas honesta de todas y porque aprendí el amor más allá de los humanos”.