



DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**COMPARACIÓN DE EFECTOS INTESTINALES EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS
DEBIDO A LA ADMINISTRACIÓN DE DIÓXIDO DE TITANIO GRADO ALIMENTICIO Y SU
ACUMULACIÓN EN CÉLULAS DE COLON**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

CAROLINA RODRÍGUEZ IBARRA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR

DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

TLALNEPANTLA DE BAZ, EDO MEX. 2022



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.

DEDICATORIA

A mis papás.

A mis amigos, que son mi familia.

A todos los que no me dejaron caer y que creyeron en mí incluso cuando yo ya no lo hacía.

A mí, a las lágrimas y los aprendizajes.

El laboratorio

Sólo buscas las pruebas que refuten tus sueños,
la ecuación perfecta que derrumbe esta luz poblada de mentiras.

Sólo buscas la vacuna precisa que te cure del mundo.

Pero cuentas con poco presupuesto,
nada tienes, excepto las antiguas palabras que la vida derrama,
equivocada,
sobre tus manos ciegas.

Solo te quedan estas prácticas de laboratorio
estas vagas hipótesis en que apuestas tu vida

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por todo el apoyo y la disponibilidad durante la realización de este posgrado.

También agradezco haber contado con la beca 626239 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) además del apoyo económico mediante el Proyecto A1-S-28619.

Agradezco al Fondo para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Estado de México (FICDTEM-2021-059) por el apoyo para el análisis de titanio y al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología de la UNAM por el apoyo en la caracterización de nanopartículas.

Agradezco los siempre acertados y constructivos comentarios de mi comité tutor, de la Dra. María Eugenia Gonsebatt y el Dr. Jesús Javier Espinosa, así como su disposición para llevar a cabo nuestras reuniones.

Finalmente, agradezco profundamente a mi tutora la Dra. Yolanda Chirino y a la Dra. Norma Laura Delgado por sus acertadas y oportunas lecciones y consejos.

RESUMEN

El dióxido de titanio grado alimenticio (E171) es uno de los aditivos más utilizados a nivel mundial para dar color blanco y opacidad a una gran variedad de alimentos, suplementos multivitamínicos y también es utilizado en productos de cuidado personal como la pasta de dientes. Sus altos niveles de consumo, así como el hecho de que el dióxido de titanio fue clasificado en el 2010 como posible carcinógeno por vía inhalatoria, ha despertado el interés de la comunidad científica para estudiar los posibles efectos adversos del consumo constante de este aditivo, así como los mecanismos de toxicidad y si estos pudieran ser reversibles. El E171 se acumula principalmente en el sistema gastrointestinal, especialmente en el intestino delgado y colon además de que se ha demostrado que aumenta la formación de tumores y la aparición de lesiones precarcinogénicas en modelos murinos de cáncer relacionados a colitis. Es por eso, que en esta tesis, con la finalidad de aportar evidencia científica que ayude a la toma de decisiones de riesgo del uso del E171 en alimentos, se investigó la susceptibilidad en ratones jóvenes y adultos a la administración subcrónica de este aditivo en concentraciones relevantes para los humanos, además de que se analizaron los cambios celulares causados por una exposición de 24 h a este aditivo y si las células de colon eran capaces de recuperarse de estas alteraciones cuando la administración fue suspendida. Se encontró que los ratones macho adultos presentan una mayor susceptibilidad a la administración de este aditivo al mostrar más cambios histológicos en colon e íleon, así como un aumento de la permeabilidad intestinal. Por otro lado, el E171 indujo la formación de especies reactivas de oxígeno de manera sostenida, cambios conformacionales en ácidos nucleicos y lípidos de las células de colon, aumento en el tamaño de los núcleos, daño al DNA, y cambios en la polimerización de la tubulina que no pudieron ser recuperados después de remover la exposición a este aditivo en el cultivo celular. En conclusión, los ratones adultos machos son más susceptibles al E171 y el retirar la exposición a E171, este se queda acumulado y no se revierten las alteraciones en células de colon.

ABREVIACIONES

8-Oxo 8-Oxo-2'-deoxyguanosine

ANSES Agencia Francesa de Seguridad y Salud Alimentaria, Ambiental y Ocupacional

A.U. Unidades arbitrarias

ANOVA Análisis de varianza

ATR-FTIR Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier de reflectancia total atenuada

BSA Albúmina de suero bovino

DCFH-DA 2',7'-diclorofluoresceína diacetato

E171 Dióxido de titanio grado alimenticio

EDTA Ácido etilendiaminotetracético

EFSA Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

FBS Suero fetal bovino

FDA Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

FGS Fluído gástrico simulado

FIS Fluído intestinal simulado

GPx Glutación peroxidasa

GR Glutación reductasa

GSSG Glutación oxidado

HyE Hematoxilina y eosina

HRP Peroxidasa de rábano

ICP-MS Espectrómetro de masas de plasma acoplado inductivamente

IPD Índice de polidispersión

JECFA Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios

NADPH Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido

NPs Nanopartículas

PBS Solución salina tamponada con fosfato

ROS Especies reactivas de oxígeno

SEM Microscopía electrónica de barrido

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN	3
CAPÍTULO 1	10
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS	10
1.1 Introducción	11
1.1.1 La nanotecnología en los aditivos alimenticios	11
1.1.2 Características del aditivo alimenticio dióxido de titanio	15
1.1.3 Regulación del uso de dióxido de titanio en los alimentos	17
1.1.4 Consumo y acumulación del E171 en la red trófica	20
1.1.5 Interacciones del E171 y su relevancia biológica	15
1.1.6 Evidencias de acumulación en humanos	25
1.1.7 Efectos adversos del E171 en el sistema gastrointestinal	27
1.2 Planteamiento del problema	31
1.3 Objetivos de la tesis	31
1.4 Referencias	32
CAPÍTULO 2	38
COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA	38
2.1 Justificación	31
2.2 Objetivos particulares	31
2.3 Métodos	40
2.3.1 Caracterización del E171	41
2.3.2 Mantenimiento y tratamiento de ratones	41
2.3.3 Evaluación de la permeabilidad intestinal	42
2.3.4 Análisis histológico de colon e íleon	44
2.3.5 Evaluación de la proliferación y el daño oxidativo al DNA en colon	44
2.3.6 Análisis estadístico	45
2.4 Resultados	46

2.4.1 Caracterización del E171	46
2.4.2 Evaluación de parámetros físicos y alimenticios de los ratones	47
2.4.3 Análisis de la permeabilidad intestinal	49
2.4.4 Alteraciones histológicas en colon e íleon	50
2.4.5 Evaluación de marcadores de proliferación y daño oxidativo al DNA en histologías de colon	55
2.5 Discusión	58
2.6 Conclusiones	59
2.7 Referencias	60
CAPÍTULO 3	64
LA ACUMULACIÓN DE DIÓXIDO DE TITANIO DE GRADO ALIMENTICIO PROVOCA ALTERACIONES CELULARES QUE PERSISTEN AÚN REMOVIENDO LA EXPOSICIÓN	64
3.1 Justificación	47
3.2 Objetivos particulares	65
3.3 Métodos	66
3.3.1 Caracterización del E171	66
3.3.2 Cultivos y tratamientos de células de colon	67
3.3.3 Viabilidad celular	67
3.3.4 Cuantificación de la internalización de E171	68
3.3.5 Análisis de granularidad celular	69
3.3.6 Cuantificación de ROS en células expuestas	70
3.3.7 Actividad de enzimas antioxidantes: GR, GPx y catalasa	70
3.3.8 Análisis de huellas dactilares de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos	72
3.3.9 Localización intracelular de partículas de E171	72
3.3.10 Rupturas de doble cadena medidas como expresión de γ H2AX	73
3.3.11 Interacción de microtúbulos con partículas de E171 durante la mitosis	74
3.3.12 Análisis estadístico	74
3.4 Resultados	75
3.4.1 Caracterización de E171	75

3.4.2 Viabilidad celular	77
3.4.3 Contenido de titanio en las células expuestas a E171	78
3.4.4 Granularidad celular	80
3.4.5 Aumento y persistencia de ROS después de la eliminación de la exposición	82
3.4.6 Actividad de las enzimas antioxidantes	82
3.4.7 Huella molecular de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos	84
3.4.8 Localización de las partículas de E171	85
3.4.9 Señalización de dalo a DNA tras retirar la exposición a E171	90
3.4.10 Interrupción de la polimerización de tubulina después de la mitosis	91
3.5 Discusión	93
3.6 Conclusiones	99
3.7 Resumen gráfico	100
3.8 Referencias	101
CAPÍTULO 4	109
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	109
4.1 Discusión	110
4.1.1 Referencias	115
4.2 Conclusión	116
4.3 Perspectivas	117
ANEXO	118
ARTÍCULOS PUBLICADOS Y CONGRESOS ASISTIDOS	119
Artículos publicados	119
Congresos asistidos	119

TABLAS & FIGURAS

FIGURAS

	Páginas
Figura 1.1. Ejemplos del uso de la nanotecnología en la industria alimenticia	12
Figura 1.2. Características fisicoquímicas de los nanomateriales.	14
Figura 1.3. Naturaleza de los nanomateriales en el sector alimenticio.	14
Figura 1.4. Línea de tiempo de la regulación del E171	20
Figura 1.5. Consumo del E171 y su bioacumulación en la red trófica	22
Figura 2.1. Esquema de administración del E171	43
Figura 2.2. Caracterización del E171	46
Figura 2.3. Parámetros de bienestar en los ratones	47
Figura 2.4. Permeabilidad intestinal	49
Figura 2.5. Histologías de colon	51
Figura 2.6. Parámetros morfométricos de histologías de colon	52
Figura 2.7. Histologías de íleon	53
Figura 2.8. Parámetros morfométricos de íleon	54
Figura 2.9. Proliferación y daño oxidativo al DNA en cortes histológicos de colon	57
Figura 3.1. Caracterización del E171	76
Figura 3.2. Formación de ROS intrínseca y capacidad fotocatalítica de E171	77
Figura 3.3. Análisis de citotoxicidad en células de colon expuestas a E171	78
Figura 3.4. Cuantificación de titanio por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).	79
Figura 3.5. Gráfica de puntos de análisis por citometría de flujo de granularidad en células de colon expuestas a E171	80
Figura 3.6. Cuantificación de células granulares tras la exposición a E171	81
Figura 3.7. Cuantificación de la producción de ROS después de la exposición a E171	82

Figura 3.8. Espectros de infrarrojos de transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) en células expuestas a E171.	85
Figura 3.9. Área bajo la curva de los espectros de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) de células expuestas a E171.	86
Figura 3.10. Localización perinuclear de partículas de E171 y área de núcleos.	88
Figura 3.11. Niveles de proteína de γ H2AX en células expuestas a E171.	90
Figura 3.12. Análisis de polimerización de tubulina en células expuestas a E171.	92
Figura 3.13. Resumen gráfico	100

TABLAS

Tabla 1.1 Interacciones del E171 con fluidos biológicos	24
Tabla 1.2 Acumulación del E171 en humanos	26
Tabla 2.1. Peso de los órganos de los ratones al finalizar el tratamiento de 90 días.	48
Tabla 3.1. Regiones analizadas mediante ATR-FTIR	73
Tabla 3.2. Actividad de enzimas antioxidantes	83

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 LA NANOTECNOLOGÍA EN LOS ADITIVOS ALIMENTICIOS

En la industria alimenticia, la nanotecnología está siendo ampliamente utilizada en empaques, como aditivos, o incluso como tratamientos antimicrobianos para mejorar las propiedades y duración de los productos (**figura 1.1**) (McClements & Xiao, 2017). La nanotecnología implica el desarrollo, caracterización y aplicación de materiales en escala nanométrica, es decir de nanopartículas (NPs). Estas son definidas como partículas de 1-100 nm y son ampliamente utilizadas en diversos procesos industriales, así como en productos que usamos en la vida diaria como alimentos, medicinas, productos de cuidado personal, ropa, protectores solares y cosméticos (Hansen et al., 2007). El uso de NPs es novedoso ya que presentan propiedades físicas y químicas únicas debido a su alta relación área superficial/volumen (p. ej., en fotocatalisis, propiedades mecánicas y ópticas), y estas propiedades difieren de las de las formas a granel correspondientes (Lamas et al., 2020). Recientemente, el uso de la nanotecnología ha sido controversial cuando es utilizada en aditivos alimenticios. Los aditivos alimenticios son sustancias que se añaden a los alimentos para mantener o mejorar su inocuidad, su frescura, su sabor, su textura o su aspecto (OMS, 2018). La utilización de aditivos solamente está justificada si responde a una necesidad tecnológica, no induce confusión al consumidor y se emplea con una función tecnológica bien definida, como la de conservar la calidad nutricional de los alimentos o mejorar su estabilidad (OMS, 2018), sin embargo, existen aditivos alimenticios que sólo se usan para mejorar las características visuales de un producto y atraer a los consumidores sin presentar una mejora en la calidad nutricional o estabilidad de los alimentos.



FIGURA 1.1. Ejemplos del uso de la nanotecnología en la industria alimenticia
La nanotecnología es utilizada desde frutas y verduras hasta alimentos procesados. Modificado de Nanowerk. <https://www.nanowerk.com/nanotechnology-in-food.php>

Existen diversos factores que afectan las propiedades fisicoquímicas de las NPs y que incluso pueden ser manipulados para lograr los efectos deseados al agregar estas a los alimentos o

al utilizarlas como medicamentos o suplementos (**figura 1.2**). Una es el tamaño de la partícula, ya que se ha visto, por ejemplo, en las NPs de TiO_2 , que al disminuir su tamaño pueden funcionar como antibacterial en el empaque de los alimentos mientras conservan un color transparente lo que ayuda a no añadir color al empaque o al alimento (Chawengkijwanich et al., 2008). Otra propiedad importante es la composición de la partícula, así como su recubrimiento, por ejemplo, el recubrimiento de NPs con polímeros como el alcohol polivinilo permite que sean internalizadas por las células para el tratamiento del cáncer (Wing & Feng., 2005). Por otro lado, aunque en la industria electrónica, textil y de energías renovables es frecuentemente modificada la forma de la partícula, en la industria alimenticia la mayoría de las NPs utilizadas son de forma esférica o amorfa (Ameta et al., 2020). En la industria alimenticia se utilizan distintos tipos de NPs, por ejemplo, las orgánicas que están compuestas de lípidos se pueden usar en bebidas, salsas y aderezos. También se utilizan NPs inorgánicas como las de SiO_2 que son utilizadas para controlar la fluidez de polvos como sales, azúcares o especias (McClements & Xiao, 2017). En los últimos años ha habido un considerable aumento en el interés por estudiar diversas NPs contenidas en alimentos. Estas se han utilizado para mejorar las propiedades organolépticas, aumentar la duración e incluso mejorar cultivos ayudando al control de plagas, también se usan como pigmentos, saborizantes, conservantes, nutrientes y nutraceuticos, o las que se usan para modificar las propiedades ópticas, reológicas o de flujo de los alimentos o envases (McClements & Xiao, 2017). También existen diversos tipos de NPs utilizadas como aditivos alimenticios, estas pueden ser metálicas, óxido metálicas, de carbono, arcillas u orgánicas (**figura 1.3**). En particular, existe preocupación sobre la incorporación directa de NPs en los alimentos, ya que, así como pueden tener un efecto benéfico y ser utilizadas en muchas nanomedicinas para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, también pueden acumularse y generar efectos adversos tras su consumo de manera crónica (Zhao y Castranova, 2011). Una de las propiedades más importantes de las NPs y por las que son ampliamente usadas en empaques de comida es que pueden tener propiedades antibacterianas y antifúngicas lo cual es benéfico para la conservación de los alimentos sin embargo al ser ingeridas pueden inducir un desbalance en la microbiota del sistema gastrointestinal (SGI). Esto ha llevado a estudiar los efectos de las

NPs en la microbiota del SGI y se ha encontrado que puede alterarla y se ha asociado a enfermedades inflamatorias como la enfermedad de intestino irritable e incluso el cáncer de colon, las cuales son enfermedades relacionadas a la inflamación y cambios en la microbiota. Uno de los materiales más frecuentemente utilizados como aditivo alimenticio es el dióxido de titanio (TiO_2) grado alimenticio o E171.

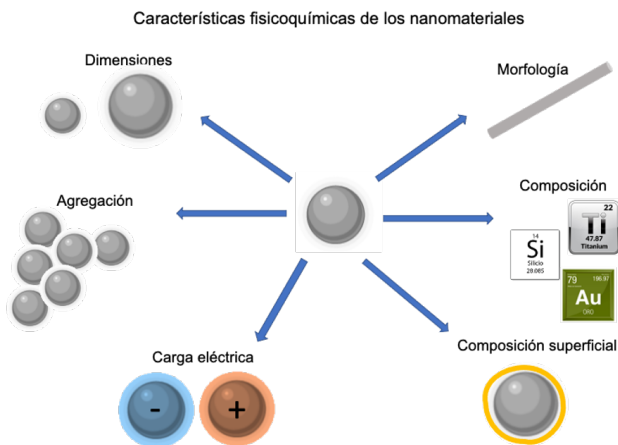


FIGURA 1.2. Características fisicoquímicas de los nanomateriales.

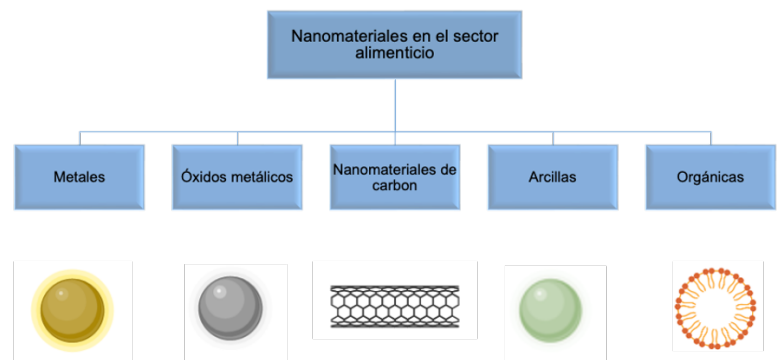


FIGURA 1.3. Tipos de NPs utilizadas en el sector alimenticio

1.1.2 CARACTERÍSTICAS DEL ADITIVO ALIMENTICIO DIÓXIDO DE TITANIO

El titanio es un elemento abundante en la Tierra y se encuentra de manera natural como TiO_2 . Su principal aplicación es como pigmento y como fotocatalizador (Weir et al., 2012). En 2019, la producción de TiO_2 , fue de 1 100 000 toneladas métricas y fue valorada en unos 3 000 millones de dólares. La distribución de uso final estimada del consumo de pigmento de TiO_2 fue pinturas (incluyendo lacas y barnices), 59%; plásticos, 20%; papel, 5%; y otros, 16%. Otros usos del TiO_2 incluyen catalizadores, cerámica, telas y textiles revestidos, revestimientos para pisos, tinta de imprenta y gránulos para techos (U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries, 2020). Es un aditivo que tiene la principal función de dar color blanco a los alimentos y que puede conferirles opacidad. Las principales materias primas para la fabricación de TiO_2 incluyen a la ilmenita (óxido de hierro y titanio, $FeTiO_3$). El TiO_2 se extrae de la ilmenita para obtener estructuras cristalinas de anatasa o de rutilo (Reglamento de la Comisión (UE) n.º 231/2012). La extracción del TiO_2 puede llevarse a cabo por medio de dos procesos, el proceso de sulfatos y el proceso de cloruro. Tanto anatasa como rutilo pueden ser producidos por el proceso de sulfato dependiendo de las condiciones de procesamiento específicas. Para producir anatasa específicamente, el oxisulfato de titanio se hidroliza y neutraliza en condiciones alcalinas. Cuando se utiliza como colorante para alimentos, recibe el nombre de E171 y cumple con ciertas características como: tener una forma amorfa, contener al menos 99% de TiO_2 y tener como contaminantes un máximo de 2% de aluminio o dióxido de silicio. Además, es insoluble en agua, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico diluido y disolventes orgánicos. Se disuelve lentamente en ácido fluorhídrico y en ácido sulfúrico caliente. En la naturaleza existen 3 fases cristalinas del TiO_2 ; anatasa, rutilo y brookita. Sin embargo, para la fabricación del E171 es principalmente utilizada la anatasa y en algunas ocasiones el rutilo (Yang et al., 2015). La anatasa es además la fase cristalina con más aplicaciones ya que presenta las mayores propiedades fotocatalíticas, es decir que en presencia de luz puede acelerar una fotorreacción formando pares electrón-hueco y propiciando la formación de especies reactivas

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y
HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

de oxígeno (ROS) capaces de sufrir reacciones secundarias que son utilizadas para el tratamiento de aire y aguas residuales (Yang et al, 2015). El TiO₂ tiene notables propiedades ópticas, con un muy alto índice de refracción y también es un compuesto muy estable. El E171 puede encontrarse con los números de identificación CI pigmento blanco 6 o como CI (1975) No. 77891 con número de CAS 13463-67-7. Inherente al proceso de producción de E171, se producen partículas de tamaños que van desde 40 hasta 250 nm y también una fracción que incluye partículas con un tamaño primario por debajo de 100 nm (Verleysen et al., 2020). Los análisis de distribución de diferentes muestras de E171 por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM) muestran que las partículas de tamaño nanométrico suelen encontrarse en una frecuencia entre el 17 % y el 36 % en número y que este porcentaje puede cambiar con respecto a la marca y país en el que se fabrica el E171 (Weir et al., 2012; Yang et al., 2014).

En cuanto a la revisión de diversos estudios en con NPs de TiO₂ como referencia para estimar los efectos que el E171 podría tener, se ha argumentado que no son una buena representación ya que, por una parte, las partículas que componen al E171 se encuentran en un rango que tamaños que incluye más de la mitad de las partículas mayores a los 100 nm, mientras que por otra parte, estas partículas forman aglomerados al estar en suspensión; los aglomerados resultan de fuerzas débiles tales como interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno, atracciones electrostáticas o adhesión por tensión superficial (EFSA, 2016). Por lo tanto, aunque las formulaciones de E171 contienen un porcentaje de NPs en su distribución de tamaño, cuando están presentes en un medio acuoso o matriz biológica como alimentos, luz gastrointestinal, sangre o tejidos internos, estas NPs se aglomeran consigo mismas y/o con otros componentes del medio en el que se suspenden (Yang et al., 2014; Donner et al., 2016; Urrutia-Ortega et al., 2016). Debido a esto, se propone que los estudios que se realicen para investigar los riesgos del consumo de E171 se hagan con el aditivo de la manera más cercana a como es consumido por los humanos y tomando en cuenta todas las interacciones que pueden ocurrir entre estas partículas y fluidos del SGI.

1.1.3 REGULACIÓN DEL USO DE DIÓXIDO DE TITANIO EN LOS ALIMENTOS

El E171 es llamado así por su regulación en la Unión Europea como un aditivo alimenticio. Los números E ("E" significa "Europa") son códigos para identificar sustancias utilizadas como aditivos alimentarios, incluidas las que se encuentran naturalmente en muchos alimentos. Los números que van del 100-200 son clasificados como aditivos alimenticios que sirven para dar color, es por esto por lo que al TiO_2 se le da el número 171. Es utilizado desde los años 1969 en diversos alimentos y es considerado seguro por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) que permite su uso hasta en 1% del peso final del producto según el código de regulaciones federales (FDA, 2022). Idealmente, el E171 muestra un diámetro de aproximadamente la mitad de la longitud de onda de la luz que se va a dispersar, es decir, la mitad de la longitud de onda de 400-700 nm del espectro de luz visible (Mie, 1908) ya que la dispersión de la luz por parte del TiO_2 y su propiedad como colorante blanco se maximiza con diámetros de 200-300 nm (Naegeli & Gsell, 2022). El E171 está compuesto por un porcentaje de NPs de TiO_2 , por lo que en años recientes se han realizado diversos estudios de toxicidad del E171 utilizando NPs de TiO_2 en representación de la parte potencialmente más tóxica del aditivo (EFSA, 2016). Estos estudios, aunque se han tomado en cuenta en la regulación del uso de este aditivo por la EFSA, también han sido descartadas debido a que no se utiliza el aditivo como tal (EFSA, 2021). Basado en la presencia de una fracción de NPs en E171, este aditivo alimenticio cae dentro de la revisión de la EFSA sobre nanotecnología, que se amplió en su revisión de 2018 para cubrir también *“un material que no está diseñado como nanomaterial pero contiene una fracción de partículas menor al 50% en la distribución número-tamaño, con una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaño de 1 a 100 nm”* (EFSA, 2021). El E171 es un aditivo alimenticio que está incluido en el CODEX alimentarius de la OMS en cooperación con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). El órgano responsable la evaluación de aditivos alimenticios es el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), un grupo internacional e independiente de expertos científicos. Este Comité comprueba la inocuidad de los aditivos alimentarios naturales y sintéticos y da la recomendación bueno para

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

el uso de aquellos que no presentan riesgos sanitarios apreciables para los consumidores. El JECFA evalúa cada aditivo alimentario sobre la base de estudios científicos de todos los datos bioquímicos, toxicológicos y de otra índole, entre ellos los ensayos obligatorios en animales, los estudios teóricos y las observaciones en seres humanos. En cuanto a los ensayos toxicológicos, se deben realizar estudios de toxicidad aguda, a corto y a largo plazo para determinar la absorción, distribución y excreción del producto y los posibles efectos perjudiciales tanto del propio aditivo como de sus subproductos para determinados niveles de exposición. El punto de partida para determinar si un aditivo alimentario se puede utilizar sin causar efectos perjudiciales es el establecimiento de la ingesta diaria admisible, que es una estimación de la cantidad de la sustancia presente en los alimentos que una persona puede ingerir a diario durante toda la vida sin que llegue a representar un riesgo apreciable para su salud. Sin embargo, la EFSA, en su revisión de 2016 estableció que no era necesario el cálculo de una ingesta diaria admisible del E171 debido a que los estudios considerados relevantes al momento demostraban que era seguro para su consumo (EFSA, 2016). El inicio del presente proyecto de doctorado fue en el año 2016 (**figura 1.4**) con la finalidad de aportar evidencias para la toma de decisiones en la regulación del E171.

La Comisión del Codex Alimentarius, que es un órgano intergubernamental conjunto de la FAO y la OMS, utiliza las evaluaciones de la inocuidad realizadas por el JECFA para fijar las dosis máximas de uso de aditivos que se pueden utilizar en los alimentos y las bebidas. El CODEX alimentario permite el uso del E171 en alimentos como quesos, polvos de leche, bebidas saborizadas de leche, postres como pudines o yogurt, fruta procesada, vegetales secos y enlatados, pastelería, cereales, productos de soya y arroz, carne procesada, mariscos procesados, huevos preservados o postres de huevo, mostazas, aderezos, ensaladas, fórmulas dietéticas, vinos, bebidas alcohólicas y comidas preparadas en general (GSFA Online, 2019). En México es permitido su uso en bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína además de tortillas y tostadas siguiendo las buenas prácticas de manufactura, según la NORMA Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011 y la NORMA Oficial Mexicana NOM-187-

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y
HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

SSA1/SCFI-2002, lo que significa que puede ser utilizada la cantidad mínima necesaria para alcanzar las propiedades deseadas y no se establece una ingesta diaria admisible (NOM, 2011). Por otro lado, la Agencia Francesa de Seguridad y Salud Alimentaria, Ambiental y Ocupacional (ANSES) en una opinión publicada en 2019, examinó la posible toxicidad oral del E171 mediante la revisión de 25 estudios más recientes. Ninguno de estos estudios confirmó o descartó un posible efecto promotor de la carcinogénesis de este aditivo. Aunque algunos de los efectos genotóxicos observados *in vitro* debidos a la exposición a varias formas de NPs de TiO₂, incluido el E171 indujeron daño al DNA a través del estrés oxidativo, estos datos no fueron suficientes para llegar a una conclusión sobre un efecto tóxico. En sus conclusiones, ANSES reiteró sus recomendaciones para caracterizar mejor la posible toxicidad al consumir E171, a través de la adquisición rápida de datos adicionales (ANSES, 2022). Las conclusiones de ANSES de 2019 fueron algunos de los elementos que tuvo en cuenta el gobierno francés al decidir suspender la comercialización en Francia de productos alimenticios que contienen el aditivo E171. La suspensión de este aditivo entró en vigor desde el 1 de enero de 2020 (ANSES, 2020).

A petición de la Unión Europea, la EFSA ha realizado evaluaciones del E171 desde el 2014, con una reevaluación en 2016. En esta reevaluación, el panel ANS de la EFSA consideró que el E171 consistía principalmente en partículas de TiO₂ de tamaño micro, con una fracción de tamaño nanométrico (<100 nm) inferior al 3.2% en masa y concluyó que, según los datos disponibles en ese momento, el E171 cuando se usaba como aditivo alimentario no generaba preocupación con respecto a la genotoxicidad y que no era cancerígeno después de la administración oral. Teniendo en cuenta la supuesta absorción limitada de TiO₂, el Panel de ANS concluyó que, con base en un margen de seguridad (MoS) calculado a partir del nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) de 2250 mg TiO₂/kg_{bw} por día (identificado a partir de un estudio en ratas de carcinogenicidad) y la exposición, calculada en base a los niveles de uso informados y los datos analíticos, el uso del E171 no sería motivo de preocupación. Sin embargo, con la información que existía hasta el momento, el panel de la EFSA recomendó estudios de una generación además de la investigación de parámetros adicionales a la

aparición de criptas aberrantes en el colon (Bettini et al, 2017). En el año 2010, el TiO_2 fue clasificado por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) como posible carcinógeno derivado de estudios en animales por vía inhalatoria. Esto despertó el interés de la comunidad científica para analizar los posibles efectos carcinógenos de este aditivo por otras vías como la oral (IARC, 2010).

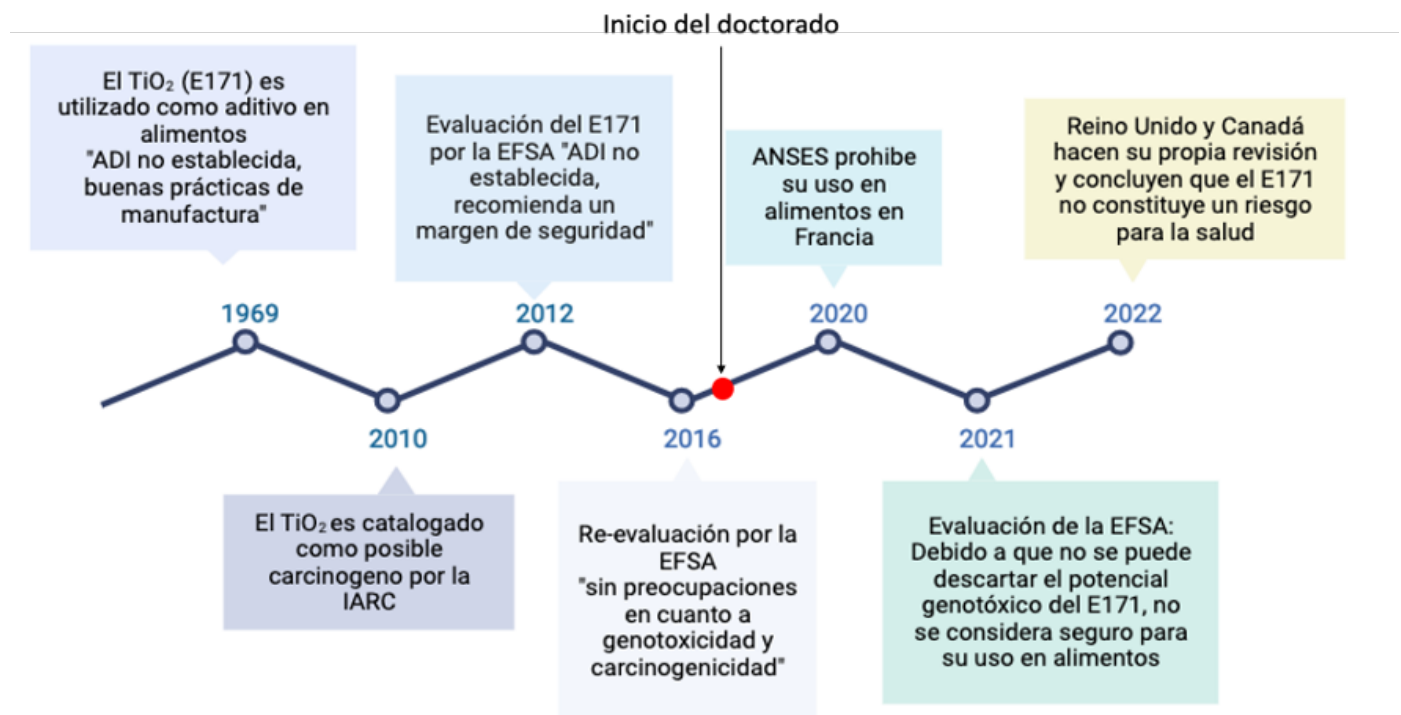


FIGURA 1.4. Línea de tiempo de la regulación del E171
En rojo se marca el inicio del presente trabajo de doctorado.

1.1.4 CONSUMO Y ACUMULACIÓN DEL E171 EN LA RED TRÓFICA

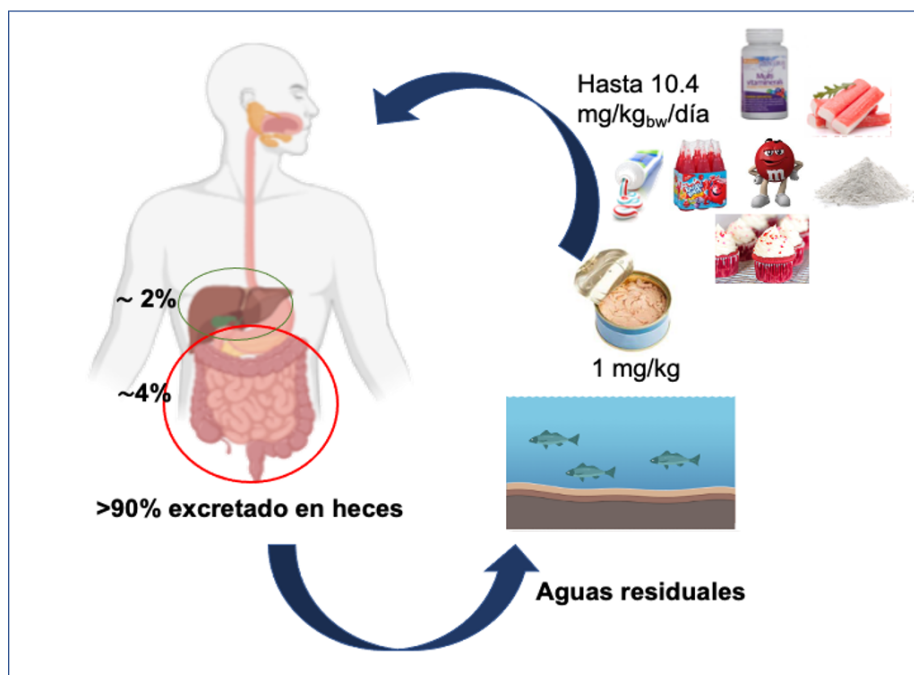
El consumo del E171 se ha calculado en diferentes países y regiones en el mundo. Este cálculo es muy importante ya que no sólo da un estimado de la cantidad de aditivo a la que la población está expuesta y por lo tanto es un elemento importante para las estimaciones de riesgo al establecer una dosis cercana a la realidad en estudios científicos, también nos dice qué poblaciones podrían tener más riesgo al haber un mayor consumo de este aditivo. En los

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y
HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

países bajos, se ha estimado que los consumidores que siguen una dieta occidentalizada y que utilizan pasta de dientes podrían tener un consumo de 0.06-5.5 mg E171/kg_{bw}/día (Rompelberg et al., 2016). Además, tomando en cuenta datos de la industria, en los países bajos se calculó que la media de una exposición a largo plazo a E171 se encuentra entre 0.5 E171/kg_{bw}/día (límite máximo 1.1 E171/kg_{bw}/día) para adultos a 1.4 E171/kg_{bw}/día (límite máximo 3.2 mg/kg bw/d) para niños (Sprong et al., 2015). Según un escenario de exposición, la EFSA estimó que los niveles de exposición diarios a E171 oscilan entre 0.2 y 1.9 mg/kg_{bw}/día en lactantes, 0.9-10.4 mg/kg_{bw}/día en niños y 0.3-6.8 E171/kg_{bw}/día en adulto. También se estima que la ingesta diaria media de partículas de TiO₂ (incluidas las partículas de tamaño nanométrico) de productos del mar y surimi oscila entre 0.02 y 3.09 E171/kg_{bw}/día, y en este caso los individuos de 20 a 30 años tienen los niveles de exposición más altos (Yin et al., 2017).

Los estudios anteriores realizan estimaciones del consumo de E171 al ser utilizado como aditivo en productos alimenticios y de cuidado personal. Sin embargo, existe evidencia de que el E171 además podría estar siendo consumido de manera no intencional al verse acumulado en animales de consumo humano. Por ejemplo, en peces de consumo humano y en mariscos enlatados se ha encontrado un contenido considerable de Ti, se cuantificó hasta 0.1 mg/kg de mariscos enlatados y se encontraron partículas con un promedio de 66 nm indicando que la acumulación de partículas de Ti se da principalmente por partículas de tamaño nanométrico (Grasso et al., 2020), este estudio da pie a considerar que la exposición de los consumidores a Ti podría ser mayor que la anteriormente calculada sólo con productos en los que el E171 era añadido de forma intencional como aditivo. En Beijing, se cuantificó la cantidad de Ti en mariscos de color blanco y productos de surimi, los niveles totales de Ti alcanzaron 6-12 µg/g (peso seco) en algunos productos del mar de color blanco, como el calamar y la sepia, mientras que se observaron concentraciones relativamente bajas en las medusas de aproximadamente 1-3 µg/g (peso seco). Para los productos alimenticios a base de surimi más consumidos localmente en el mercado, las concentraciones de Ti oscilaron entre 2 y 81 µg/g (peso seco). La evaluación de la exposición mostró que la ingesta diaria promedio de partículas de TiO₂ a

través de los alimentos varió de 0.02 a 3.09 $\mu\text{g TiO}_2/\text{kg}_{\text{bw}}/\text{día}$, y que los jóvenes de 20 a 30 años mostraron el nivel más alto de exposición (Yin et al., 2017). Además, se estudiaron muestras de surimi congelado en España por medio de fraccionamiento de flujo de campo de flujo asimétrico acoplado a dispersión de luz dinámica (DLS) y espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) y se encontró que el contenido de TiO_2 en cuatro surimis a niveles de concentración se encuentra en el intervalo de los $\mu\text{g/g}$ (de 3.14 ± 0.10 a $14.55 \pm 1.46 \mu\text{g Ti/g}$) además de que las partículas de TiO_2 se encontraron en el intervalo de



tamaños de 50-90 nm y 160-170 nm (Ojeda et al., 2020). Por otro lado, se encontró que algunas muestras de surimi contenían TiO_2 NP en concentraciones de $1,40 \times 10^7$ a $1,19 \times 10^9$ NP/g) además de que las distribuciones de tamaño de las NPs de TiO_2 fueron muy diferentes entre las muestras, y algunas de

ellas mostraron intervalos de tamaño amplios (el tamaño más frecuente varió de 53.8 a 62.1 nm; mientras que los valores de tamaño promedio estuvieron dentro del intervalo de 73.4-217.5 nm) (Taboada-López et al., 2019).

1.1.5 INTERACCIONES DEL E171 Y SU RELEVANCIA BIOLÓGICA

Un aspecto fundamental al evaluar los efectos tóxicos del E171 y que agrega otro nivel de complejidad al estudio de este aditivo es la presencia de moléculas unidas a la superficie que

alteran las propiedades externas (Marucco et.al., 2020). Alrededor de las partículas de E171 se pueden adsorber moléculas que modifican las características fisicoquímicas de las partículas, como el diámetro, el estado de agregación o aglomeración, las interacciones con las membranas celulares, la biodisponibilidad, la distribución sistémica y los efectos adversos. El término “corona” se introdujo para denotar la unión de macromoléculas de una matriz biológica determinada a la superficie de las NPs (Coreas et.al., 2020). Las partículas de E171 se pueden rodear con componentes de los alimentos, componentes del jugo gastrointestinal y, después de la absorción intestinal, proteínas plasmáticas (McClements et al., 2016; Li et al., 2017). El alcance de tales interacciones moleculares depende de las propiedades fisicoquímicas de la superficie como las cargas, el revestimiento y diámetro de las partículas (Saptarshi et al., 2013). Una superficie exterior muy curvada aumenta el ángulo de deflexión entre las macromoléculas absorbidas, lo que posiblemente conduce a una mayor densidad de macromoléculas en la proteína corona de partículas pequeñas en comparación con las de mayor diámetro (Naegeli & Gsell, 2022). Estas consideraciones, así como las propiedades fisicoquímicas propias de las NPs destacan la importancia de una caracterización completa del material para una evaluación de sus efectos en los sistemas biológicos (Naegeli & Gsell, 2022). Debido a lo anterior, se han realizado diversos estudios para analizar las interacciones de las partículas que componen al E171 tanto como con sustancias contenidas en los alimentos, los alimentos mismos o con fluidos biológicos, estos se resumen en la **tabla 1.1**. Al ser digerido en fluidos gastrointestinales, el E171 forma aglomerados debido a la alta fuerza iónica además de la formación de una proteína corona parcialmente reversible que contiene iones de fosfato y proteínas, estos aglomerados son de mayor tamaño en el fluido intestinal simulado (FIS) que en el fluido gástrico simulado (FGS) donde se encontraron aglomerados de hasta 500 μm de tamaño (Marucco et al., 2020; Dufey et al., 2021; Rodríguez-Escamilla et al., 2019). Por otro lado, el E171 permanece intacto al pasar por la digestión y puede afectar la actividad de enzimas como la amilasa (Dufey et al., 2021). También se ha descrito, que la proteína corona que se forma alrededor de las partículas de E171 está conformada principalmente de lípidos y de enzimas y que la formación de esta corona podría contribuir a un menor estrés

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

oxidante pero no disminuye la genotoxicidad (Marucco et al., 2020; Coreas et al., 2020). Además, el E171 puede interferir en la digestión de lípidos y de la vitamina D3 (VD3) disminuyendo significativamente la biodisponibilidad de la VD3 del 80 al 74 % al aumentar el E171 del 0 al 0.5 % en peso (Li et al., 2021). Todos estos estudios demuestran, además de que es necesario una caracterización de las partículas y los aglomerados que forman en los fluidos en los que son suspendidas, que es importante cuidar la forma de administración del E171 en modelos in vivo ya que las propiedades de las partículas pueden verse afectadas por los fluidos con los que interactúan (Naegeli & Gsell, 2022).

Tabla 1.1 Interacciones del TiO₂ con fluidos de relevancia biológica

Modelo y medio de dispersión	Resultados y observaciones	Cita
Fluidos gastrointestinales humanos, células de cáncer de colon HCT116	Formación de una proteína corona parcialmente reversible que contiene iones de fosfato y proteínas, la proteína corona redujo la formación de ROS, sin embargo, no se vieron alterados los efectos genotóxicos	Marucco et al., 2020
Modelo estático de digestión que simula las fases oral, gástrica e intestinal con fluidos simulados que incluyen enzimas	Permanece intacto al pasar por la digestión, pero forma grandes aglomerados en FIS	Dudefoi et al., 2021.
Diferentes condiciones de ayuno o de presencia de comida en ratones	La proteína corona que se forma alrededor de las partículas de E171 está conformada principalmente de lípidos y de las enzimas añadidas	Coreas et al., 2020
Fabricación de pellets para ratones con 1% de E171	El E171 formó aglomerados más grandes al interactuar con componentes de los pellets y	Rodríguez-Escamilla et al., 2019

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

	mayores aglomerados en el FIS que en el FGS	
Emulsiones de aceite en agua en un modelo simulado del SGI humano	La biodisponibilidad de VD3 disminuyó significativamente	Li et al., 2021

ROS: Especies reactivas de oxígeno; FGS: Fluido gástrico simulado; FIS: Fluido intestinal simulado; VD3: Vitamina D3.

1.1.6 EVIDENCIAS DE ACUMULACIÓN DEL E171 EN HUMANOS

Pocos estudios se han realizado analizando los efectos del E171 en humanos, sin embargo, las evidencias que existen se han enfocado en analizar la acumulación y biocinética del E171 al ser ingerido (**tabla 1.2**). En voluntarios humanos se observó que el E171 puede alcanzar la sangre desde las 2 h de haber sido ingerido con un pico máximo de concentración en sangre a las 6 h después de su ingesta y que después de este tiempo la concentración en sangre disminuyó lo que puede indicar su posible traslocación a otros órganos (Peters et al., 2015). Por otro lado, el Ti se ha encontrado acumulado en bazo e hígado de cadáveres por medio de espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente de alta resolución (ICP-HR-MS) indicando que el E171 podría ser acumulado principalmente en estos órganos. Tomando en cuenta lo anterior y que la exposición media a E171 es de 200-2800 mg/kg de peso corporal por día (escenario calculado por el Panel ANS de la EFSA, 2016), que corresponde a ~8,4 y 117 mg de Ti por día (Heringa et al., 2016). Y asumiendo que la mayoría del Ti corporal está presente en el hígado y el bazo y que todo el Ti corporal se deriva del E171 consumido por la dieta, el Panel de la EFSA estima que la disponibilidad sistémica oral del E171 en humanos sería inferior al 1% como máximo (EFSA 2021). Contrastantemente, en otro estudio en cadáveres humanos la concentración media en las muestras de hígado donde se pudo cuantificar Ti fue de 0.03 mg/g, la de bazo de 0.06 mg/g, la de riñón de 0.08 mg/g, la de yeyuno de 0.34 mg/g y la de íleon de 0.43 mg/g indicando que el íleon sería el órgano con mayor

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

acumulación. Además, en todos los tejidos analizados, el contenido de Ti fue mayor en mujeres que en hombres (Peters et al., 2020). Por otro lado, en recién nacidos se ha encontrado Ti en el meconio además de NPs de TiO₂ en la placenta de las madres lo cual indica que hay transferencia placentaria de este compuesto (Guillard et al., 2021). Estos resultados indican que podríamos ser propensos a acumular Ti en órganos como bazo, riñones, hígado e intestino delgado pero que además podría existir una exposición a este aditivo desde la gestación. Por otro lado, con base en los estudios en humanos, el Panel de la EFSA en 2021, consideró que el E171 tiene una disponibilidad sistémica oral baja, probablemente no superior al 0.5% y que puede atravesar la placenta y transferirse al feto (EFSA, 2021). Sin embargo, es importante resaltar que la acumulación del Ti no se ha investigado en todos los órganos de humanos, por lo que cabe la posibilidad de que se esté acumulando en otros órganos además de los antes mencionados. Además, la cantidad de E171 que se consume está directamente relacionado al estilo de vida por lo que los tamaños de muestra de humanos necesitarían ser más amplios para hacer una mejor estimación de la cantidad de Ti acumulada en órganos.

Tabla 1.2 Acumulación de E171 en humanos

Modelo	Acumulación	Tamaño de partículas	Cita
Sangre de voluntarios que ingirieron cápsulas de E171 de 100 mg de forma oral	Se encontró en sangre a las 2 h de haber sido ingerido con un pico máximo a las 6 h. La concentración máxima encontrada fue de 10 ppb.	No especificado	Pele et al., en 2015
Cadáveres humanos (9 mujeres y 6 hombres de 79 a 104 años)	La concentración media en las muestras en las que se pudo determinar Ti fue de 40 ng/g en el hígado y de 80 ng/g en el bazo.	El tamaño de partícula promedio fue de 86 a 426 nm en el hígado y de 88 a 445 nm en el bazo.	Heringa et al., 2016

<p>Hígado de 15 sujetos humanos fallecidos, ocho mujeres y siete hombres, de 64 a 97 años</p>	<p>La concentración media en las muestras de hígado donde se pudo cuantificar Ti fue de 0.03 mg/g, la de bazo de 0.06 mg/g, la de riñón de 0.08 mg/g, la de yeyuno de 0.34 mg/g y la de íleon de 0.43 mg/g.</p>	<p>Entre 50 y 500 nm en los diferentes tejidos, siendo 50 nm el límite inferior de detección de tamaño</p>	<p>Peters et al., 2020</p>
<p>Meconio de recién nacidos y placentas</p>	<p>Ti en el meconio además de NPs de TiO₂ en la placenta de las madres lo cual indica que hay transferencia placentaria de este compuesto</p>	<p>De 70-100% de partículas recuperadas menores a 100 nm.</p>	<p>Guillard et al., 2021</p>

1.1.7 EFECTOS ADVERSOS DEL E171 EN EL SISTEMA GASTROINTESTINAL

Existen diversos estudios que han sido claves para el análisis del riesgo que podría presentar para los humanos el consumo de E171. Estos estudios han sido realizados tanto en modelos murinos como en líneas celulares de humano. En el 2016, se demostró que el E171 puede aumentar la formación de tumores en un modelo de carcinogénesis en ratones (Urrutia-Ortega et al., 2016), por lo que aumentó el interés de la comunidad científica por investigar la influencia que podría tener el E171 en la carcinogénesis. Además, se demostró la absorción y el depósito de E171 en roedores tras exposición oral repetida, donde se observó la acumulación de E171 en el hígado y el intestino de ratones, a una dosis comparable a los niveles de exposición humanos. La inflamación en el intestino y el estómago de los ratones expuestos, así como el aumento de la producción de superóxido tras el tratamiento con E171, destacaron la necesidad de considerar los riesgos para la salud humana como resultado de la exposición dietética al E171 (Talamini et al., 2019). Además, la exposición a E171 aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el colon y el hígado, lo que se ha relacionado con el hecho de que estos son los órganos con mayor acumulación de E171 según lo reportado en modelos experimentales de roedores administrados con 5 mg/kg_{bw} 3 veces a la semana por 21 días (Talamini et al., 2019). El estrés oxidativo puede ser causado por un aumento en la producción

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y
HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

de especies reactivas de oxígeno (ROS) acompañado de un deterioro de la defensa enzimática antioxidante. En este sentido, se puede detectar un aumento de la actividad de enzimas antioxidantes como la enzima glutatión reductasa (GR), la enzima glutatión peroxidasa (GPx) y la actividad de la catalasa en células gliales expuestas a NPs de TiO₂ (Huerta-García et al., 2014).

Por otro lado, aunque se ha demostrado que para ser letal en ratas, el E171 se tendría que administrar en concentraciones muy altas (de hasta 1000 mg/kg_{bw}), el E171 fue internalizado en las células que recubren los tejidos estomacales de las ratas, y los niveles de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y de IgM fueron significativamente más bajos en la sangre de las ratas expuestas a E171 en comparación con el control, además, el nivel de superóxido dismutasa 2 (SOD-2) disminuyó con el aumento de la acumulación de Ti (Han et al., 2020). Se han realizado diversos estudios en ratones con E171, en un estudio se administró E171 a ~5 mg/kg_{bw} en el agua para beber durante 16 semanas y los ratones se alimentaron con una dieta normal (DN) o una dieta alta en grasas (DAG). En ratones alimentados con una DN y administrados con E171, el E171 promovió la ansiedad, indujo adenomas en el colon, hipertrofia e hiperplasia de las células caliciformes y sobreexpresión de mucinas, pero no tuvo efectos tóxicos sobre el tejido testicular o espermatozoides. Mientras que en ratones alimentados con DAG, el E171 promovió la esteatosis micro vesicular en el hígado (Medina-Reyes et al., 2020). Esto indica que el E171 podría hacer sinergia con una alimentación alta en grasas para inducir alteraciones en el hígado de los ratones. Por otro lado, considerando que el E171 puede estar compuesto de hasta 44% de partículas de tamaño nanométrico, se ha estudiado cómo la fracción nanométrica podría afectar la barrera intestinal en combinación con otras sustancias como los lipopolisacáridos (LPS). Ratones fueron alimentados con 1% de TiO₂ NPs y micropartículas (TiO₂ MPs) por 1, 3 y 6 meses y después administrados con LPS, ambas administraciones con distintos tamaños de TiO₂ aumentaron notablemente la relación entre la longitud de las vellosidades intestinales y la profundidad de las criptas del intestino y aumentaron la expresión de las proteínas de uniones estrechas del íleon (ZO-1 y ocludina) después de 1 mes de exposición. Después de 6 meses de exposición,

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y
HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

las NP de TiO₂ redujeron el consumo de alimento, las MP de TiO₂ causaron microvellosidades en el intestino delgado y elevaron el contenido de Ti en las células sanguíneas, sin embargo, la permeabilidad intestinal no cambió en ambos grupos expuestos a TiO₂ (Zhang et al., 2021). Por otra parte, también se han estudiado los efectos sobre el tracto gastrointestinal específicamente con respecto al sistema inmune, por ejemplo, en ratas expuestas por vía oral durante una semana a E171, se detectó titanio en las células inmunes de las placas de Peyer (PP), también la frecuencia de células dendríticas aumentó en PP, mientras que las células T reguladoras involucradas en amortiguar las respuestas inflamatorias disminuyeron con la administración de E171, un efecto que aún se observa después de 100 días de tratamiento. Además, el tratamiento con E171 de 100 días promovió la microinflamación del colon e inició lesiones preneoplásicas al tiempo que fomentaba el crecimiento de focos de criptas aberrantes en un modelo de carcinogénesis inducida por químicos en ratones (Bettini et al., 2017). Con base en estos estudios se sabe que el E171 puede ser acumulado en colon e intestino delgado y que además puede inducir cambios histológicos, lesiones preneoplásicas, acumularse en células del sistema inmune e inducir inmunotoxicidad. Además de que en sistemas *in vivo* se han estudiado puntos como la inflamación, formación de tumores y la acumulación del E171, en diversos sistemas *in vitro* que representan o que incluyen células del SGI, se han investigado puntos importantes como alteraciones estructurales de las células, daño a DNA, proliferación y la formación de ROS por ser características de la carcinogénesis. A nivel celular, E171 altera la permeabilidad paracelular en un modelo *ex vivo* de intestino de ratones (Brun et al., 2014) e induce la formación de micronúcleos en células de cáncer colorrectal (Proquin et al., 2017). Dado que las NP de TiO₂ se internalizan en el citoplasma de las células del colon (Pedata et al., 2019), se podrían encontrar posibles alteraciones del citoesqueleto que provoquen daños estructurales. Por una parte, se han estudiado cambios en la estructura celular de la línea Caco-2Bbe1, que son células diferenciadas de intestino que presentan microvellosidades, al exponerlas a 350 ng/mL de E171 (es decir, 100 ng/cm² de área de superficie celular). Mediante el uso de dos técnicas independientes para eliminar los efectos de la sedimentación del E171 en el cultivo, se descubrió que la ruptura de las microvellosidades

**COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y
HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA**

era independiente de la sedimentación. Estos datos indican que la exposición al E171 provocó la pérdida de microvellosidades del sistema celular Caco-2BBE1 debido a una respuesta biológica, y no simplemente a un artefacto físico de la exposición *in vitro* (Faust et al., 2014). Por otra parte, se ha investigado si el E171 pudiese inducir daño al DNA en células de cáncer de colon (HCT116) y en células normales de colon (Caco-2) por medio de la técnica de micronúcleos y el ensayo cometa que detectan rupturas en el DNA, se encontró que el E171 podía inducir daño al DNA de forma concentración dependiente sin afectar la viabilidad de las células (Proquin et al., 2017). Además, se ha intentado elucidar el mecanismo por el cual el E171 podría causar daño en las células y por lo tanto se ha investigado si puede inducir la formación de ROS. En células de estómago (AGS), después de 24 h de exposición, el E171 fue internalizado y localizado en la región perinuclear disminuyendo la expresión de las proteínas relacionadas con el estrés del retículo endoplásmico y la proteína antioxidante SOD-2 (Han et al., 2020). Sin embargo, no se ha investigado qué tanto pueden durar estos efectos en las células y si son reversibles. Además de que el mecanismo de la inducción de alteraciones por la exposición a E171 no ha sido determinado.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El E171 es uno de los aditivos más utilizado en alimentos y como excipiente en tabletas y sirve para dar color blanco y opacidad. Diversos estudios han comprobado que existe una constante acumulación del E171 en órganos del SGI, especialmente en colon. Además, se sabe que el consumo de este aditivo puede ser mayor en niños que en adultos lo cual podría señalar un grupo poblacional con mayor impacto por el consumo de E171. Por otro lado, Francia y la Unión Europea han prohibido su consumo debido a que su potencial genotóxico no puede ser descartado. Mientras que Estados Unidos, Canadá y México siguen permitiendo su uso y consumo en alimentos debido a que los estudios sobre el E171 no se consideran relevantes y/o concluyentes. Se ha demostrado que el E171 puede causar aumento de tumores en un modelo murino de cáncer colorrectal y que puede ser genotóxico en células de colon, sin embargo, es importante investigar la susceptibilidad de individuos sanos haciendo énfasis en poblaciones como son jóvenes y adultos y machos y hembras. Por otro lado, es importante comprender los mecanismos celulares que participan en la toxicidad de este aditivo y si al retirar este aditivo los efectos que causa en las células son reversibles o podrían ser acumulativos.

1.3 OBJETIVO DE LA TESIS

El objetivo de esta tesis es investigar la susceptibilidad a alteraciones histológicas en colon e íleon y cambios en la permeabilidad intestinal de ratones jóvenes y adultos, hembras y machos debido a la administración subcrónica de E171 por vía oral. Y evaluar la acumulación y persistencia de alteraciones en células de colon al retirar la exposición a E171 para determinar si existen posibles alteraciones remanentes incluso al suspender el consumo del E171.

1.4 REFERENCIAS

1. Ameta, S.K., Rai, A.K., Hiran, D., Ameta, R., Ameta, S.C. (2020). Use of Nanomaterials in Food Science. In: Ghorbanpour, M., Bhargava, P., Varma, A., Choudhary, D. (eds) Biogenic Nano-Particles and their Use in Agro-ecosystems. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2985-6_24
2. ANSES. (2020). <https://www.anses.fr/en/content/titanium-dioxide>
3. Bettini, S., Boutet-Robinet, E., Cartier, C., Coméra, C., Gaultier, E., Dupuy, J., Naud, N., Taché, S., Grysan, P., Reguer, S., Thieriet, N., Réfrégiers, M., Thiaudière, D., Cravedi, J. P., Carrière, M., Audinot, J. N., Pierre, F. H., Guzylack-Piriou, L., & Houdeau, E. (2017). Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Scientific reports*, 7, 40373. <https://doi.org/10.1038/srep40373>
4. Bouwmeester, H., Brandhoff, P., Marvin, H. J. P., Weigel, S., & Peters, R. J. B. (2014). State of the safety assessment and current use of nanomaterials in food and food production. *Trends in Food Science & Technology*, 40(2), 200-210. <https://doi:10.1016/j.tifs.2014.08.009>
5. Coreas, R., Cao, X., Deloid, G. M., Demokritou, P., & Zhong, W. (2020). Lipid and protein corona of food-grade TiO₂ nanoparticles in simulated gastrointestinal digestion. *NanoImpact*, 20, 100272. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100272>
6. EFSA. (2018). Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health. *EFSA J* 16(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5327>
7. European Commission. (2011). Regulation (EU) No 1169/2011 of the European parliament and of the council of 25 October 2011. *Journal of the European Union*, 25-32. <https://doi.org/10.1075/ttwia.27.04ker>
8. European Commission. (2015). Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No

1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97. Journal of the European Union, 1-22. <https://doi.org/10.1075/ttwia.27.04ker>

9. FAO/WHO. (1997). Food consumption and exposure assessment of chemicals. Geneva. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/63988>

10. Faust, J. J., Doudrick, K., Yang, Y., Westerhoff, P., & Capco, D. G. (2014). Food grade titanium dioxide disrupts intestinal brush border microvilli in vitro independent of sedimentation. *Cell biology and toxicology*, 30(3), 169-188. <https://doi.org/10.1007/s10565-014-9278-1>

11. FDA: U.S. Food and Drug Administration. (2022). CFR - Code of Federal Regulations Title 21. [https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=73.575#:~:text=\(1\)%20The%20quantity%20of%20titanium,is%20authorized%20by%20such%20standards.](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=73.575#:~:text=(1)%20The%20quantity%20of%20titanium,is%20authorized%20by%20such%20standards.) <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.012>. ISSN 0924-2244,

12. Grasso, A., Ferrante, M., Zuccarello, P., Filippini, T., Arena, G., Fiore, M., Cristaldi, A., Conti, G. O., & Copat, C. (2020). Chemical Characterization and Quantification of Titanium Dioxide Nanoparticles (TiO₂-NPs) in Seafood by Single-Particle ICP-MS: Assessment of Dietary Exposure. *International journal of environmental research and public health*, 17(24), 9547. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249547>

13. GSFA Online. FAO/WHO. (2019). Updated up to the 42nd Session of the Codex Alimentarius Commission (2019). <https://www.fao.org/gsfaonline/additives/details.html?id=184>.

14. Han, H. Y., Yang, M. J., Yoon, C., Lee, G. H., Kim, D. W., Kim, T. W., Kwak, M., Heo, M. B., Lee, T. G., Kim, S., Oh, J. H., Lim, H. J., Oh, I., Yoon, S., & Park, E. J. (2021). Toxicity of orally administered food-grade titanium dioxide nanoparticles. *Journal of applied toxicology*, 41(7), 1127-1147. <https://doi.org/10.1002/jat.4099>

15. Hansen, S. F., Larsen, B. H., Olsen, S. I. & Baun, A. (2017). Categorization framework to aid hazard identification of nanomaterials. *Nanotoxicology* 1, 243-250.

16. Heringa, M. B., Geraets, L., van Eijkeren, J. C., Vandebriel, R. J., de Jong, W. H., & Oomen, A. G. (2016). Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure, including toxicokinetic considerations. *Nanotoxicology*, 10(10), 1515-1525. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1238113>
1. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 93. (2010). National Minerals Information Center, Mineral commodity summaries data release: U.S. Geological Survey data release, <https://doi.org/10.5066/P9KKMCP4>.
17. Lamas, B., Martins Breyner, N., & Houdeau, E. (2020). Impacts of foodborne inorganic nanoparticles on the gut microbiota-immune axis: potential consequences for host health. *Particle and fibre toxicology*, 17(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00349-z>
18. Li, Q., Li, T., Liu, C., DeLoid, G., Pyrgiotakis, G., Demokritou, P., Zhang, R., Xiao, H., & McClements, D. J. (2017). Potential impact of inorganic nanoparticles on macronutrient digestion: titanium dioxide nanoparticles slightly reduce lipid digestion under simulated gastrointestinal conditions. *Nanotoxicology*, 11(9-10), 1087-1101. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1398356>
19. Li, C., Zhang, R., Ma, C., Shang, H., McClements, D. J., White, J. C., & Xing, B. (2021). Food-Grade Titanium Dioxide Particles Decreased the Bioaccessibility of Vitamin D3 in the Simulated Human Gastrointestinal Tract. *Journal of agricultural and food chemistry*, 69(9), 2855-2863. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06644>
20. Marucco, A., Prono, M., Beal, D., Alasonati, E., Fisicaro, P., Bergamaschi, E., Carriere, M., & Fenoglio, I. (2020). Biotransformation of Food-Grade and Nanometric TiO₂ in the Oral-Gastro-Intestinal Tract: Driving Forces and Effect on the Toxicity toward Intestinal Epithelial Cells. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 10(11), 2132. <https://doi.org/10.3390/nano10112132>
21. McClements, D.J., Xiao, H. (2017). Is nano safe in foods? Establishing the factors impacting the gastrointestinal fate and toxicity of organic and inorganic food-grade nanoparticles. *Science of Food* 1(1):6. <https://doi.org/10.1038/s41538-017-0005-1>

22. Medina-Reyes, E. I., Delgado-Buenrostro, N. L., Díaz-Urbina, D., Rodríguez-Ibarra, C., Déciga-Alcaraz, A., González, M. I., Reyes, J. L., Villamar-Duque, T. E., Flores-Sánchez, M. L., Hernández-Pando, R., Mancilla-Díaz, J. M., Chirino, Y. I., & Pedraza-Chaverri, J. (2020). Food-grade titanium dioxide (E171) induces anxiety, adenomas in colon and goblet cells hyperplasia in a regular diet model and microvesicular steatosis in a high fat diet model. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 146, 111786. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111786>
23. Mehran, M., Roghayieh, R., Abdullah, K.O., Azra, F., David, J.M. (2022). Interactions between nanoparticle-based food additives and other food ingredients: A review of current knowledge. *Trends in Food Science & Technology*, Volume 120,
24. Mie, G. (1976). Contribution to the optical properties of turbid media, in particular of colloidal suspensions of metals. *Annals of Physics*. 1908;25:377-445.
25. Naegeli, H., & Gsell, C. (2022). "Nano-ghosts": Risk assessment of submicron-sized particles in food biased towards fictional "nano". *EXCLI journal*, 21, 279-299. <https://doi.org/10.17179/excli2022-4630>
26. Ojeda, D., Taboada-López, M. V., Bolea, E., Pérez-Arantegui, J., Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, A., & Laborda, F. (2020). Size characterization and quantification of titanium dioxide nano- and microparticles-based products by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation coupled to Dynamic Light Scattering and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytica chimica acta*, 1122, 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.080>
27. Peters, R. J. B., Bouwmeester, H., Gottardo, S., Amenta, V., Arena, M., Brandhoff, P., Aschberger, K. (2016). Nanomaterials for products and application in agriculture, feed and food. *Trends in Food Science & Technology*, 54, 155-164. <https://doi:10.1016/j.tifs.2016.06.008>
28. Proquin, H., Rodríguez-Ibarra, C., Moonen, C. G., Urrutia Ortega, I. M., Briedé, J. J., de Kok, T. M., van Loveren, H., & Chirino, Y. I. (2017). Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis*, 32(1), 139-149. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew051>

29. Saptarshi, S. R., Duschl, A., & Lopata, A. L. (2013). Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of nanobiotechnology*, 11, 26. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-26>
30. Sprong, C., Bakker, M., Niekerk, M., Vennemann, F. (2015). Exposure assessment of the food additive titanium dioxide (E 171) based on use levels provided by the industry. National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven. RIVM Letter report 2015-0195. <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2015-0195.pdf>
31. Taboada-López, M. V., Herbello-Hermelo, P., Domínguez-González, R., Bermejo-Barrera, P., & Moreda-Piñeiro, A. (2019). Enzymatic hydrolysis as a sample pre-treatment for titanium dioxide nanoparticles assessment in surimi (crab sticks) by single particle ICP-MS. *Talanta*, 195, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.023>
32. Talamini, L., Gimondi, S., Violatto, M.B., Fiordaliso, F., Pedica, F., Tran, N.L., Sitia, G., Aureli, F., Raggi, A., Nelissen, I., Cubadda, F., Bigini, P., Diomedea, L. (2019). Repeated administration of the food additive E171 to mice results in accumulation in intestine and liver and promotes an inflammatory status. *Nanotoxicology*, 13(8):1087-1101. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1640910>
33. Verleysen, E., Waegeneers, N., Brassinne, F., De, Vos, S., Jimenez, I.O., Mathioudaki, S., Mast, J. (2020). Physicochemical characterization of the pristine E171 food additive by standardized and validated methods. *Nano*, 10(3):592. <https://doi.org/10.3390/nano10030592>
34. Win, K. Y., & Feng, S. S. (2005). Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26(15), 2713-2722. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.050>
35. Yang, Y., Doudrick, K., Bi, X., Hristovski, K., Herckes, P., Westerhoff, P., & Kaegi, R. (2014). Characterization of food-grade titanium dioxide: the presence of nanosized particles. *Environmental science & technology*, 48(11), 6391-6400. <https://doi.org/10.1021/es500436x>
36. Yin, C., Zhao, W., Liu, R., Liu, R., Wang, Z., Zhu, L., Chen, W., & Liu, S. (2017). TiO₂ particles in seafood and surimi products: Attention should be paid to their exposure and

uptake through foods. *Chemosphere*, 188, 541-547.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.168>

37. Zhang, Z. (2019). Development of a standardized food model for studying the impact of food matrix effects on the gastrointestinal fate and toxicity of ingested nanomaterials. *NanoImpact*, 13:13-25. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2018.11.002>

38. Zhao, J., Castranova, V. (2011). Toxicology of nanomaterials used in nanomedicine. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, 14(8), 593-632. <https://doi.org/10.1080/10937404.2011.615113>

CAPÍTULO 2

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

2.1 JUSTIFICACIÓN

El E171 es uno de los aditivos más utilizados en alimentos. Se sabe que induce genotoxicidad en células de cáncer de colon y exacerba tumores en un modelo murino de colitis (Proquin et al., 2019, Urrutia-Ortega et al., 2017), e induce estrés oxidativo y una respuesta inflamatoria que involucra disbiosis y altera la integridad de la barrera en intestino delgado y colon, principalmente en modelos de colitis y obesidad (Barreau et al., 2021; Lamas et al., 2020; Yan et al., 2020; Pinget et al., 2019). En contraste, después de 100 días de administración por medio de la dieta de E171 en ratas, no se reportaron toxicidad ni alteraciones en el sistema inmune y órganos (Blevins et al., 2019), lo que demuestra que aún existe controversia sobre los efectos de E171 después de la administración oral y faltan estudios que investiguen los efectos de E171 en ratones sanos. Aunque existe acumulación de E171 en diferentes órganos (Jani et al., 1994), se ha observado la formación de tumores y lesiones preneoplásicas principalmente en el colon (Urrutia-Ortega et al., 2017), por lo que es fundamental conocer el mecanismo de la formación de tumores en este tejido, además de evaluar alteraciones en la permeabilidad intestinal (Michielan et al., 2015). Para mejorar las decisiones en cuanto a la regulación del uso de este aditivo, es necesario realizar estudios de más de 90 días, en individuos sanos y con una dosis cercana a lo consumido por humanos (EFSA, 2016). Además, es importante tomar en cuenta que, por una parte, el consumo en jóvenes y adultos varía por los hábitos alimenticios y, por otra parte, los adultos pierden la eficiencia en los sistemas de reparación del DNA que ayudan a mantener la integridad de las células. Debido a esto, en este trabajo se buscó comparar la susceptibilidad en colon e íleon de ratones jóvenes y adultos, hembras y machos.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar cambios en la permeabilidad intestinal debido al consumo oral de E171 durante 3 meses en ratones comparando la susceptibilidad de los ratones entre jóvenes y adultos, machos y hembras.
- Evaluar las alteraciones histológicas en íleon y colon debido al consumo oral de E171 durante 3 meses comparando la susceptibilidad entre ratones jóvenes y adultos, machos y hembras.
- Evaluar la proliferación celular en colon debido al consumo oral de E171 en ratones comparando la susceptibilidad entre ratones jóvenes y adultos, machos y hembras.
- Cuantificar un producto de la oxidación del DNA en tejido de colon debido al consumo oral de E171 comparando ratones jóvenes y adultos, machos y hembras.

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Caracterización del E171

El TiO₂ de grado alimenticio (E171) se obtuvo de Sensient Colors México. Se obtuvieron imágenes de las partículas que componen al E171 mediante microscopía electrónica de barrido (SEM; JEOL JEM 1010, Japón). Para identificar la fase cristalina del E171, se analizaron los espectros Raman (espectrómetro Almega XR Raman; Allentown PA, EE. UU.) en la región espectral entre 300 y 2000 cm⁻¹. Se utilizó un microscopio Olympus (100 y 0.90 NA: apertura numérica) para enfocar el láser en muestras sólidas y para recoger la luz dispersada en una configuración de retrodispersión de 180 °C. Además, los espectros Raman se acumularon durante 25 s con una resolución de ~4 cm⁻¹, la fuente de excitación fue una radiación de 532 nm de un láser Nd:YVO 4 (frecuencia duplicada) y la potencia del láser en la muestra fue de 2.5 mW. El tamaño hidrodinámico (nm), el potencial zeta (mV) y el índice de polidispersión del E171 se midieron en agua para beber (10 mg/mL) mediante dispersión dinámica de luz en un analizador Zeta Plus (Brookhaven, NY, EE. UU.).

2.3.2 Mantenimiento y tratamiento de ratones

En este estudio se analizaron las alteraciones en el tracto gastrointestinal de ratones macho y hembras, jóvenes y adultos con la finalidad de comparar la susceptibilidad de estos a la administración subcrónica (90 días) del E171. El E171 fue administrado 3 veces a la semana en dosis de 10 mg/kgbw lo cual es una buena representación de la dosis consumida por los humanos según lo reportado por la EFSA (consumo máximo de 10.4mg/kgbw). El E171 utilizado en este estudio fue obtenido de la empresa Sensient Colors lo cual es una buena representación del aditivo que se usa directamente en los alimentos. Este aditivo fue resuspendido en agua para beber como se realizó en el estudio de Talamini et al., 2019, además la administración de la suspensión con E171 se realizó por medio de un goteo lento directamente en el hocico de los animales, esto con la finalidad de semejar el consumo humano en el que las partículas pasan por todo el tracto gastrointestinal. Esto es importante ya que se

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

ha demostrado que las partículas de E171 pueden interactuar con las proteínas y contenidas en los fluidos biológicos como la saliva, el fluido intestinal y el fluido gástrico y por lo tanto, es importante que la administración pase por la digestión a través de estos tres fluidos. Para este protocolo se emplearon 40 ratones macho y hembras, jóvenes (5-7 semanas) y adultos (>33 semanas), de la cepa C57BL/6 los cuales se mantuvieron a temperatura ambiente (21 °C) con ciclos de luz y oscuridad de 12 h. Previo al inicio de la administración del E171, fueron aclimatados por 5 días. El alimento y agua potable fueron proporcionados *ad libitum*. El proyecto se encuentra aprobado por la comisión de bioética de la FES Iztacala, con número de aprobación (CE/FESI/092017/1196).

Los ratones fueron separados aleatoriamente en 6 cajas, cada una con 5 ratones, para dar seguimiento a los siguientes tratamientos:

- Machos jóvenes control (CT)
- Machos jóvenes E171
- Hembras jóvenes control (CT)
- Hembras jóvenes E171
- Machos adultos control (CT)
- Machos adultos E171
- Hembras adultas control (CT)
- Hembras adultas E171

Los ratones fueron administrados con 10 mg/kg_{bw} al día 3 veces a la semana (lunes, miércoles y viernes) de acuerdo con el procedimiento descrito por Talamini et al., 2021. En un total de 30 µL de agua para beber, se administró el E171 para alcanzar la concentración final deseada. La concentración fue calculada con base al peso promedio de los ratones que fue de 30 g para los ratones adultos y 26 g para los ratones jóvenes. Además, todos los grupos fueron monitoreados en cuanto al peso corporal y se cuantificó el consumo de agua y alimento de manera semanal. Finalmente, los ratones fueron sacrificados, los órganos se pesaron inmediatamente y se calculó el peso promedio con respecto al peso del ratón, sus tejidos

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

fueron procesados para histología. El tratamiento de los ratones, así como la disposición de los residuos se hizo conforme a las normas NOM-062-ZOO-1999 y NOM-087-ECOL-SSA1-2002 respectivamente.

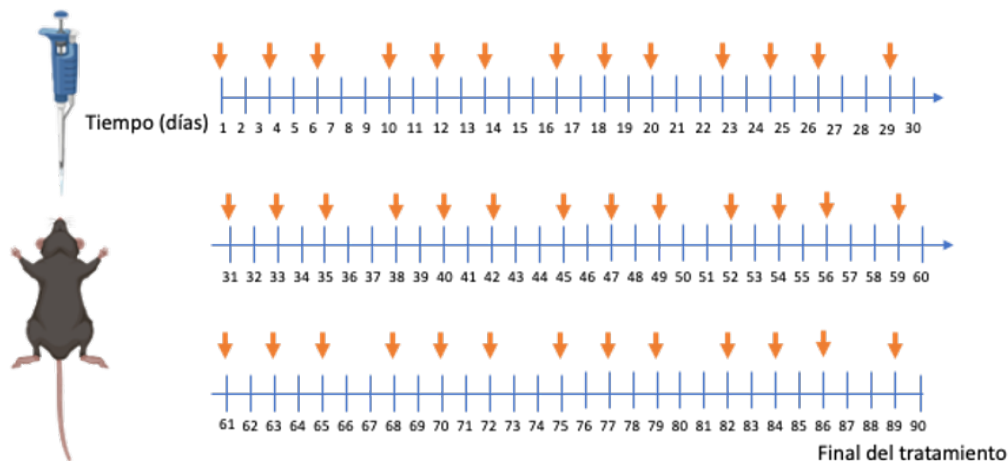


FIGURA 2.1. Esquema de administración del E171

El E171 fue administrado por medio de un goteo oral en un total de 30 μL de volumen. Se administró lo necesario para alcanzar 10 mg/kg_{bw} de E171 resuspendido en agua para beber 3 veces a la semana por 90 días.

2.3.3 Evaluación de la permeabilidad intestinal

Para evaluar la permeabilidad intestinal al finalizar el tratamiento por 90 días, se utilizó Isotiocianato acoplado a una molécula de dextran (FITC-Dextran), siguiendo el método de Woting (2018). Después de 2 h de ayuno, a los ratones se les administraron 15 mg por vía intragástrica de FITC-Dextran de 4 kD (FD4, Sigma-Aldrich, EE. UU.) en un total de 150 mL de agua para beber. Tras 45 min, se recolectaron 200 μL de sangre por medio de un corte en la cola, en un tubo cubierto con EDTA. Se aislaron los sueros centrifugando a 1500 rpm por 10 min, se tomaron 100 μL de suero y se añadieron 50 μL de PBS para detectar la intensidad de la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 491 y de emisión 516 por medio de un espectrofluorómetro (EPOCH, Biotek).

2.3.4 Análisis histológico de colon e íleon

Al finalizar el tratamiento los ratones fueron sacrificados y se extrajo el colon (además se extrajeron otros órganos como íleon, riñones y bazo para registrar su peso y se conservaron para futuros análisis), los órganos fueron fijados con alcohol absoluto, se deshidrataron y se embebieron en parafina para realizar cortes de 3 μm . Los cortes fueron teñidos con la tinción de Hematoxilina y Eosina (HyE) como se describe a continuación: Los tejidos fueron desparafinados por 30 min a 58 °C, posteriormente fueron sumergidos en xilol 1 (2 min), xilol 2 (2 min), alcohol-xilol 1:1 (2 min), alcohol absoluto (2 min), alcohol al 95% (2 min), alcohol 80% (2 min), agua (2 min), teñidos con hematoxilina (15 min; SigmaAldrich, HHS32), los tejidos fueron sumergidos en agua amoniacal al 0.02% y posteriormente en Eosina (3 min; SigmaAldrich, 318906). Fueron deshidratados siguiendo los pasos indicados anteriormente en el orden contrario y se montaron con Entellan (Merck, 107961), se observaron al microscopio y se tomaron imágenes a 10x y 40x. Se realizó una cuantificación por medio del programa ImageJ de la longitud de la capa muscular, la capa de la mucosa que contiene las criptas del colon y la luz del íleon. Los resultados se muestran en píxeles y/o píxeles² en el caso del área de la luz del íleon. Se tomaron al menos 10 cuantificaciones por imagen y 5 imágenes por grupo.

2.3.5 Evaluación de la proliferación y el daño oxidativo al DNA en colon

Se realizaron cortes histológicos de colon de 3 μm y se deshidrataron como lo indicado en la sección 2.3.4. Posteriormente, se realizó la recuperación antigénica del tejido, se permeabilizó con acetona fría por 15 min. Seguido a esto, se realizó el bloqueo con albúmina sérica de bovino al 2% por 2 h a temperatura ambiente. El tejido se incubó 12 h con el anticuerpo primario para Ki67 (1:200; ab15580, Abcam) que es una proteína nuclear que es un marcador de proliferación celular, seguido a esto, se incubaron los tejidos por 12 h con el anticuerpo primario para 8-oxo (8-Oxo-2'-deoxyguanosine 1:200, 2Q2311, Abcam) que es el principal producto de la oxidación del DNA. Los tejidos fueron lavados con PBS-Tween 20 al 1% y posteriormente

fueron incubados por 2 h a 37 °C con los anticuerpos secundarios Alexa fluor 488 (1:1000; ab150077, Abcam) y Alexa fluor 647(1:1000; ab150115, Abcam), además de Hoechst (1:1000; 33342, ThermoScientific) para localizar los núcleos. Finalmente, los tejidos fueron lavados con PBS y montados con PBS:Glicerol (1:1). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal (Leica TCS-SP8, Alemania) y la fluorescencia se cuantificó mediante el software LASX Life Science (Leica).

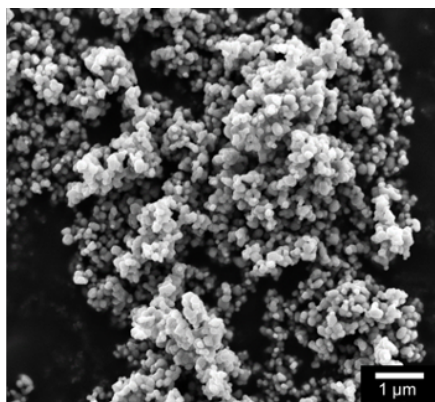
2.3.6 Análisis estadístico

Los datos se presentan como promedio \pm error estándar de al menos 5 individuos y se analizaron por medio de ANOVA de tres vías (para analizar los datos peso corporal, consumo de agua y alimento) y de dos vías para el análisis de la permeabilidad intestinal. Todos los datos fueron analizados y graficados con el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). Las diferencias de $*p<0.05$ fueron consideradas significativas.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Caracterización del E171

Como primera aproximación para evaluar las características fisicoquímicas del E171 en la forma en que fue administrado a los ratones, caracterizamos este aditivo en agua para beber en cuanto al tamaño de los aglomerados que forma y al potencial Z así como el índice de polidispersión. Realizamos una dilución de E171 en una concentración de 10 mg/mL para lograr la dosis deseada que se les administró a los ratones (10 mg/kg_{bw}). Al analizar la forma del E171 por medio de SEM, se observó que las partículas tienen una forma amorfa y con una distribución de partículas menores a 1 μ M como se observa en la imagen de la **figura 2.2**. Por otro lado, el E171 formó aglomerados con un promedio de 482.57 nm en agua para beber, lo cual es congruente con los aglomerados que se han reportado del E171 en los alimentos. Adicionalmente, el potencial Z fue de -16.73 mV indicando que en la superficie de los aglomerados se encuentran cargas negativas y el índice de polidispersión fue de 0.37 (**figura 2.2**).



Medio de dispersión	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)	Índice de polidispersión
Agua para beber	482.57±159.79	-16.73±0.32	0.37±0.02

FIGURA 2.2. Caracterización del E171

Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM). El E171 fue caracterizado en agua para beber en una concentración de 10 mg/mL. Los datos muestran como la media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

2.4.2 Evaluación de parámetros físicos y alimenticios de los ratones

Se evaluaron parámetros físicos considerados como parámetros de bienestar como la ingesta de agua y alimento, peso corporal y peso de los órganos de los ratones. No se encontraron diferencias significativas en el peso corporal al comparar los pesos corporales finales ($\alpha=0.05$) (**figura 2.3A**). Sin embargo, al comparar la ganancia de peso total a lo largo del tratamiento, los machos adultos y los machos jóvenes administrados con E171 mostraron una ganancia de peso corporal de 5 g en promedio en comparación de sus respectivos controles ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.001$) (**figura 2.3B**). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el consumo de agua y alimento ($\alpha=0.05$) (**figura 2.3C y D**). Por otra parte, el peso de los órganos se muestra como peso relativo (en porcentaje) lo cual fue calculado con respecto al peso total del ratón (**Tabla 2.1**). No hubo diferencias significativas en el peso de los órganos ni en la longitud del colon al comparar los ratones jóvenes y adultos, machos y hembras administrados con E171 contra su respectivo control ($\alpha=0.05$).

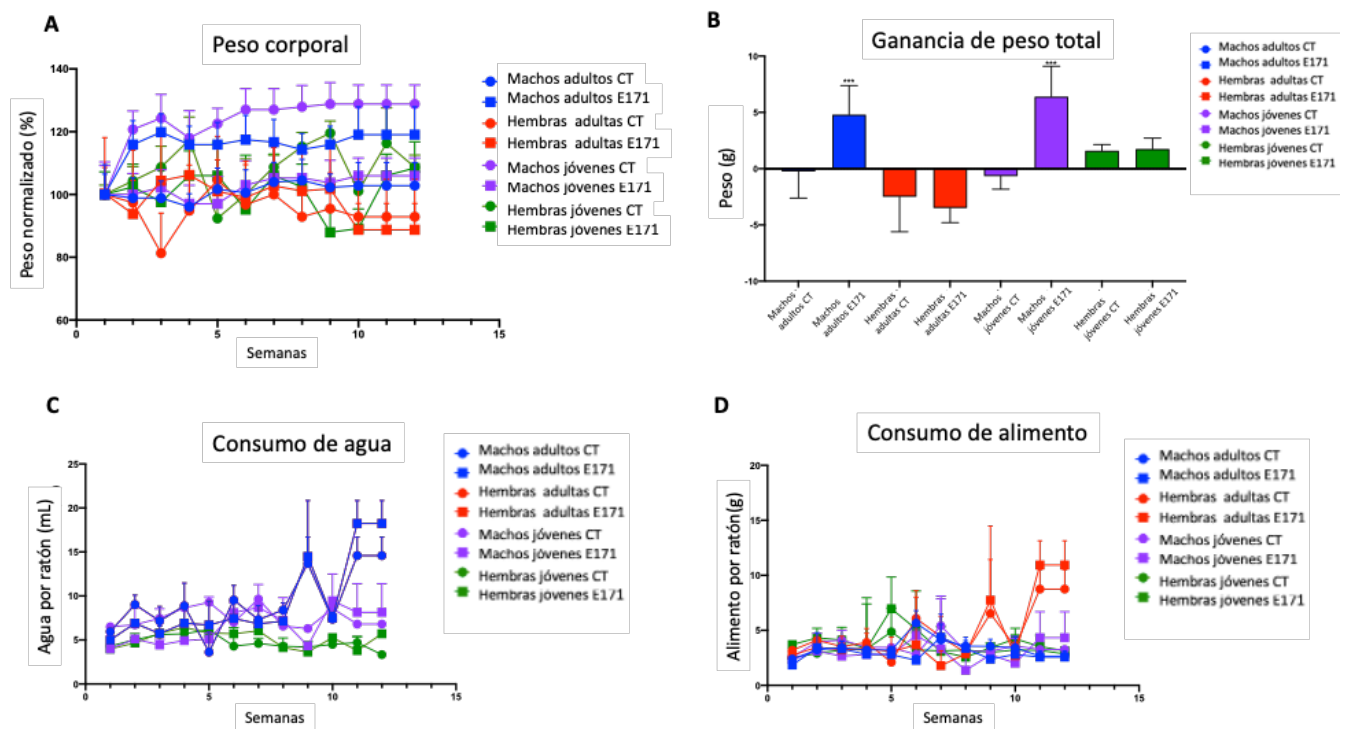


FIGURA 2.3. Parámetros de bienestar en los ratones

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

A. Peso corporal a través de los 3 meses de tratamiento; **B.** peso total ganado o perdido durante el tratamiento; **C.** consumo de agua y; **D.** consumo de alimento. Todas las medidas se muestran en gramos (g). Los datos muestran la media \pm error estándar de al menos 5 ratones por grupo. *** $p \leq 0.001$ vs control

TABLA 2.1. Peso relativo de los órganos de los ratones al finalizar el tratamiento de 90 días.

Órgano		Machos		Hembras	
		Control	E171	Control	E171
Hígado	Jóvenes	4.70 \pm 0.27	4.81 \pm 0.46	5.12 \pm 0.64	3.16 \pm 1.29
	Adultos	5.06 \pm 0.38	4.27 \pm 0.55	3.71 \pm 1.79	5.04 \pm 0.40
Bazo	Jóvenes	0.39 \pm 0.03	0.35 \pm 0.03	0.43 \pm 0.13	0.34 \pm 0.09
	Adultos	0.38 \pm 0.5	0.34 \pm 0.6	0.56 \pm 0.28	0.75 \pm 0.19
Riñones	Jóvenes	1.57 \pm 0.06	1.65 \pm 0.1	1.83 \pm 0.1	1.76 \pm 0.45
	Adultos	1.71 \pm 0.09	1.51 \pm 0.07	1.94 \pm 0.5	0.93 \pm 0.23
Colon	Jóvenes	0.98 \pm 0.20	0.88 \pm 0.03	1.14 \pm 0.51	1.14 \pm 0.18
	Adultos	1.14 \pm 0.09	0.90 \pm 0.11	1.10 \pm 0.14	0.68 \pm 0.27

El peso relativo de los órganos se muestra en porcentajes. Fue calculado con respecto al peso de cada ratón. Se muestran los valores del promedio del porcentaje \pm error estándar.

2.4.3 Análisis de la permeabilidad intestinal

Debido a que se han reportado alteraciones en el tracto intestinal tras la administración del E171, y para analizar la funcionalidad del intestino, se evaluó la permeabilidad intestinal por medio de la absorción de FITC-Dextran de 4 kDa. Cuantificamos la fluorescencia del FITC-Dextran en el suero de los ratones después de administrarlo por vía oral y permitir la absorción de este complejo en la sangre. La fluorescencia en suero de ratones macho adultos administrados con 10 mg/kg_{bw} E171 aumentó 25 veces en comparación de los ratones control adultos ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.001$), mientras que en los ratones jóvenes no se observó un aumento significativo de la permeabilidad. En las hembras adultas administradas con E171, la permeabilidad intestinal aumentó 10 veces en comparación con las hembras adultas control ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.001$). Mientras que, en las hembras jóvenes, la permeabilidad intestinal no mostró cambios al compararlas con su control (*figura 2.4*).

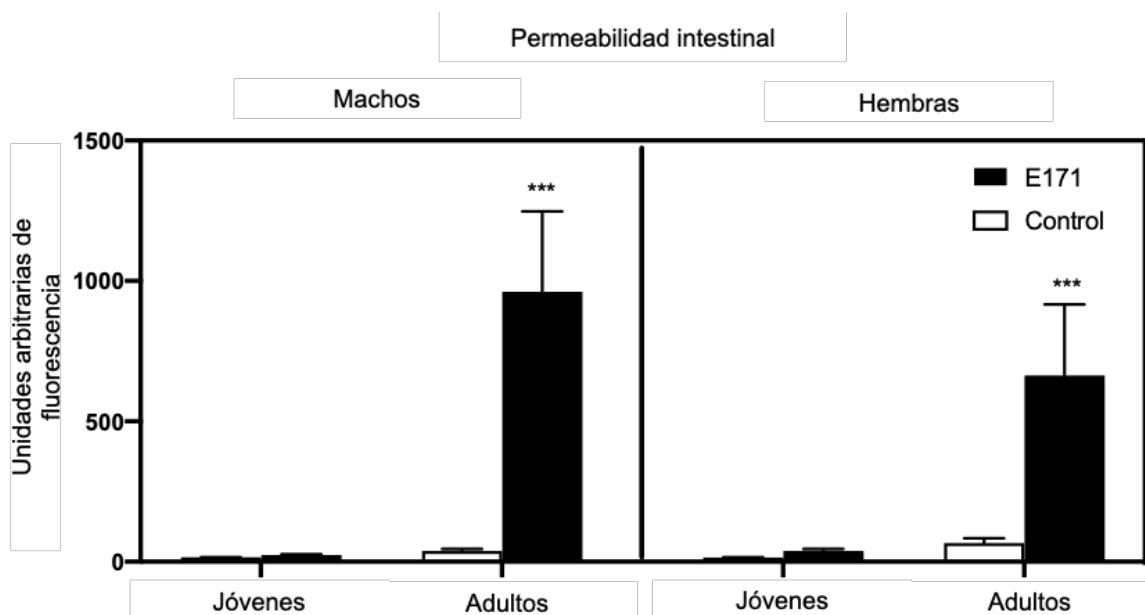


FIGURA 2.4. Permeabilidad intestinal

La permeabilidad intestinal fue medida cuantificando la fluorescencia del FITC-Dextran en suero de al menos 3 ratones. Los datos muestran la media \pm error estándar de tres experimentos independientes

por ratón. La fluorescencia se reporta como unidades arbitrarias. *** $p \leq 0.001$ vs control adultos de su mismo sexo.

2.4.4 Alteraciones histológicas en colon e íleon

Debido a que se encontró un aumento en la permeabilidad intestinal y a que se ha reportado que el E171 se acumula en íleon y colon, se analizaron estos tejidos. Para analizar la arquitectura histológica de íleon y colon de los ratones, teñimos cortes de estos órganos con HyE. A partir de las histologías de estos órganos en las que se observó un hiperplasia en criptas en tanto en el colon como en el íleon de los ratones adultos con E171 (**figura 2.5 y 2.7**), y el aumento de la celularidad en las capas musculares y mucosa, se realizaron cuantificaciones del ancho de estas capas en colon. En las imágenes tomadas de cortes histológicos del íleon se cuantificaron las capas mucosa y muscular así como del área de la luz del túnel y se graficaron en la **figura 2.8**. En el colon, se observó un aumento del grosor de la capa mucosa de 50% en ratones macho adultos administrados con E171 comparados con los ratones macho adulto control mientras que la capa muscular del tejido aumentó de grosor en un 50% ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.001$) (**figura 2.6**). Por otro lado, en el íleon de los ratones, se observó un aumento de 100% en la luz del túnel de los ratones macho adultos administrados con E171 en comparación de los ratones adultos control ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.001$) (**figura 2.8**). y un aumento de 125% en la capa mucosa de las hembras adultas administradas con E171 en comparación de las hembras adultas control ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.001$).

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

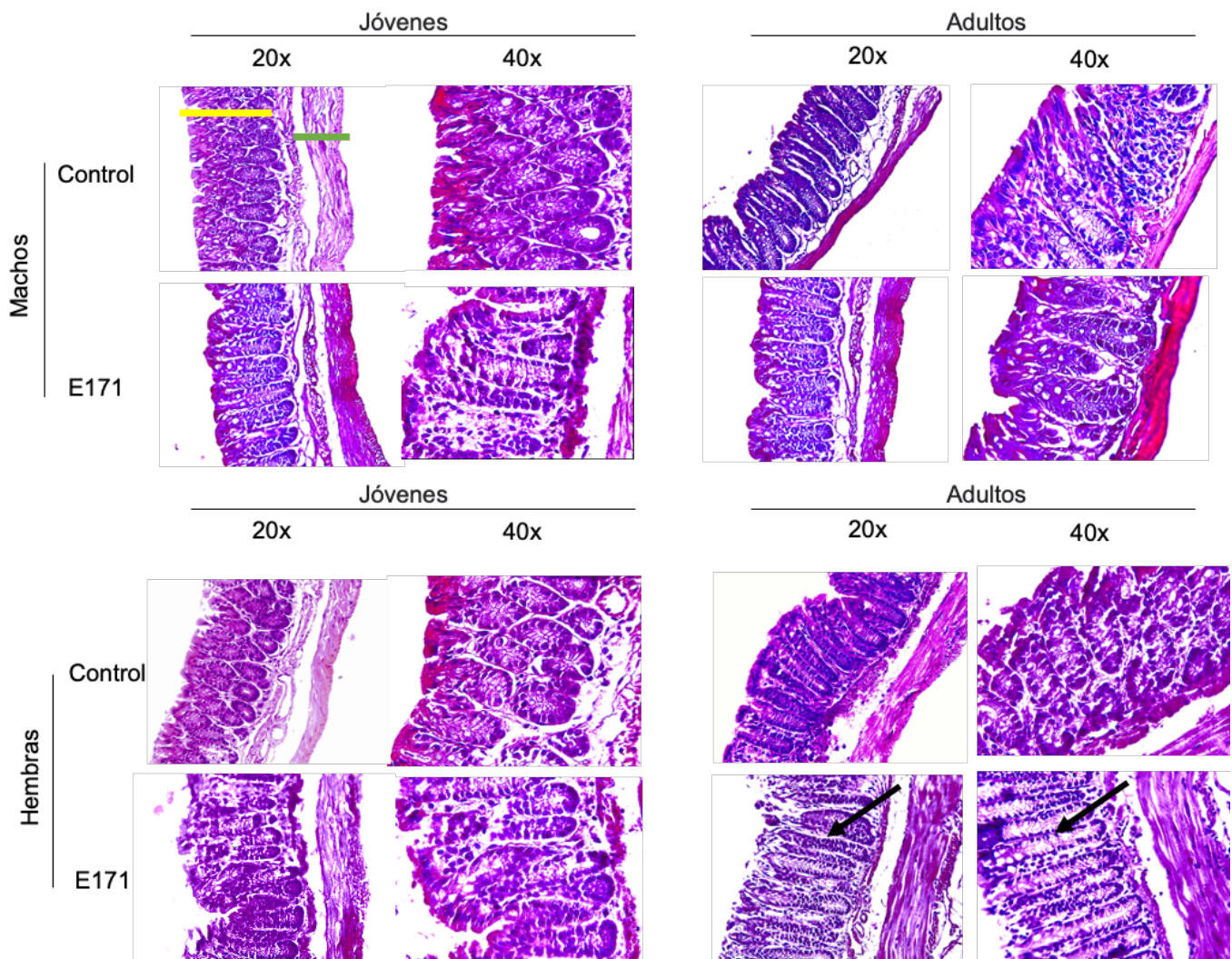


FIGURA 2.5. Histologías de colon

Se muestran imágenes representativas de histologías de colon teñidas con hematoxilina y eosina. Las imágenes se tomaron a 20x y 40x. Las imágenes de 20x fueron utilizadas para las cuantificaciones de la capa muscular y la capa de la mucosa. Un ejemplo de la zona que se tomó en cuenta para las cuantificaciones se encuentra en la imagen que corresponde al control jóvenes machos 20x: la capa mucosa del colon se muestra marcada con una línea amarilla mientras que la capa muscular se encuentra marcada con una línea verde. Las flechas negras indican criptas hiperplásicas en las imágenes de colon de hembras adultas administradas con E171 en la imagen con un aumento de 40x.

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

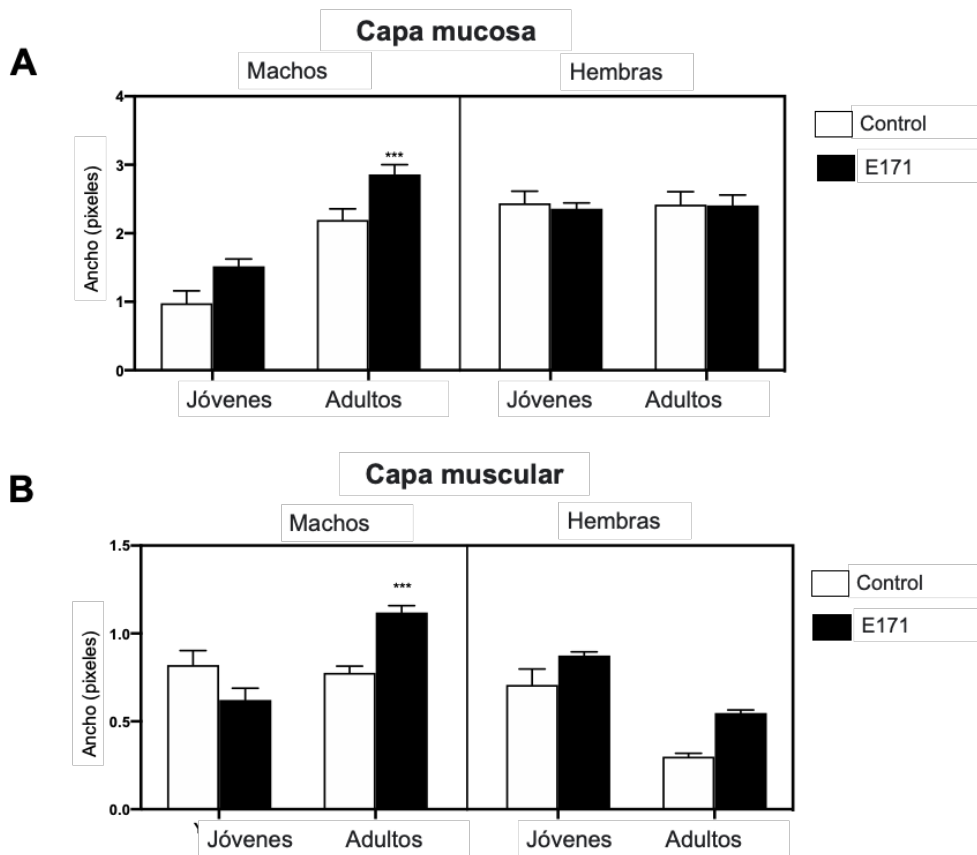


FIGURA 2.6. Parámetros morfométricos de histologías de colon.

Se realizaron cuantificaciones de la capa mucosa y la capa muscular de imágenes tomadas de histologías de colon por medio de un microscopio óptico, las imágenes fueron analizadas en el programa ImageJ. Los datos se presentan como longitud en píxeles. *** $p \leq 0.001$ vs control adultos de su mismo sexo, ** $p \leq 0.01$ vs control adultos de su mismo sexo.

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

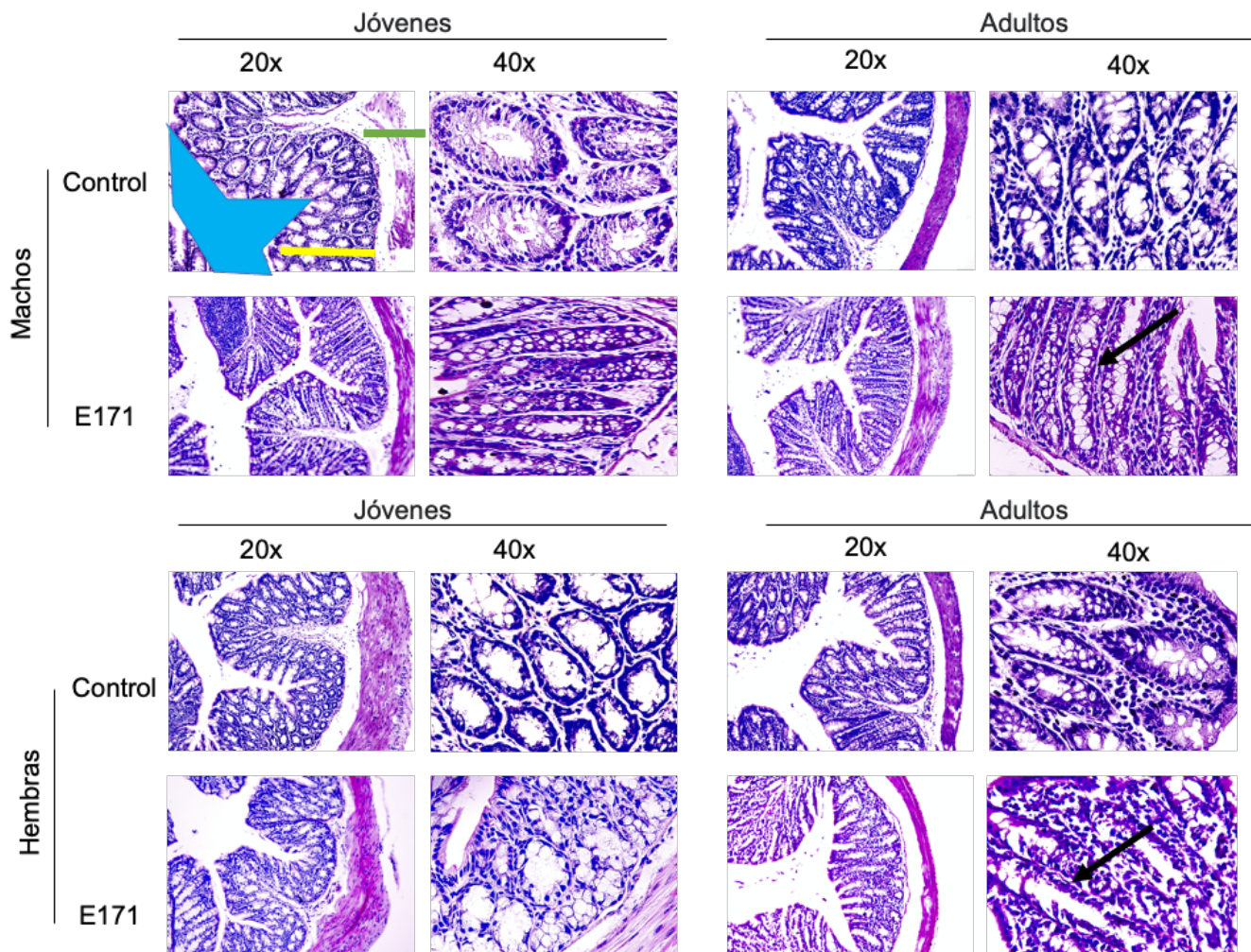


FIGURA 2.7. Histologías de íleon.

Se muestran imágenes representativas de histologías de colon teñidas con hematoxilina y eosina. Las imágenes se tomaron a 20x y 40x. Las imágenes de 20x fueron utilizadas para las cuantificaciones de la capa muscular y la capa de la mucosa. Un ejemplo de la zona que se tomó en cuenta para las cuantificaciones se encuentra en la imagen que corresponde al control jóvenes machos 20x: la capa mucosa se encuentra señalada con una línea amarilla, la capa muscular con una línea verde, el túnel está señalado en azul. Las flechas negras indican las criptas hiperplásicas en machos y hembras adultos en imágenes con un aumento de 40x.

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

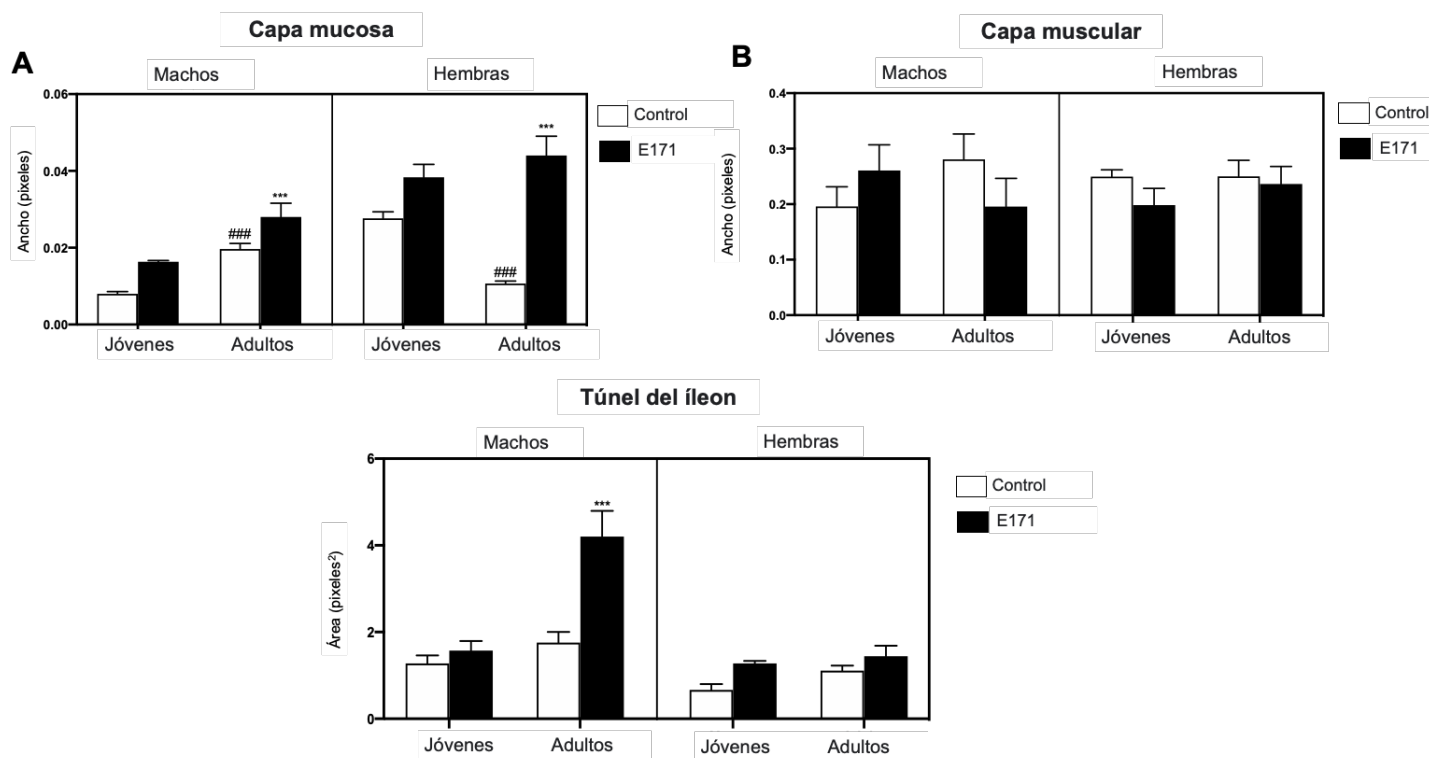


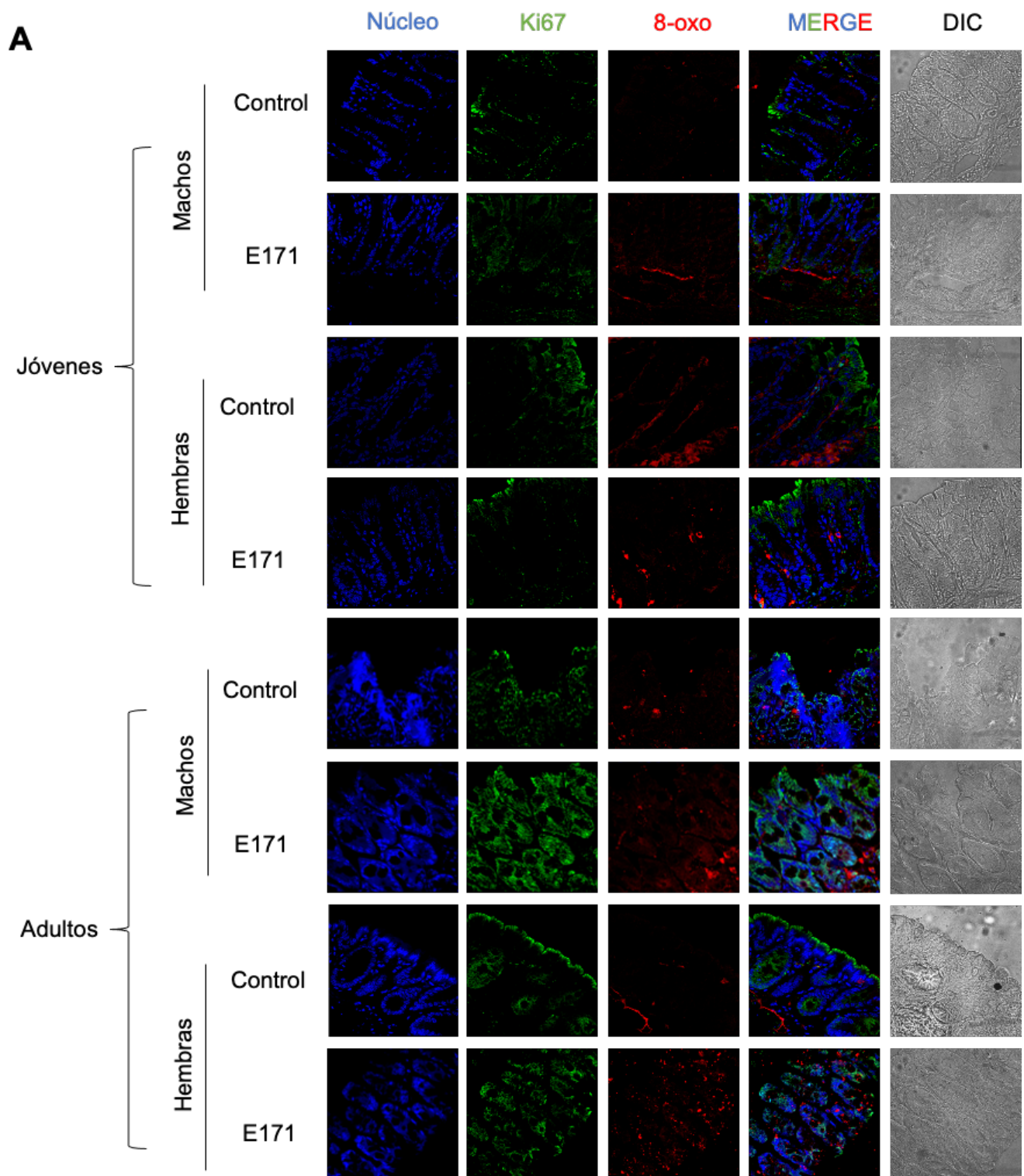
FIGURA 2.8. Parámetros morfométricos de íleon

Se cuantificaron la A. Capa mucosa, B. Capa muscular y C. Túnel del íleon en al menos 5 laminillas por grupo. Los datos se presentan como ancho en pixeles o área en pixeles². Las mediciones fueron realizadas en imágenes tomadas con un aumento del 20x con ayuda del programa ImageJ. ***p≤0.001 vs control adultos de su mismo sexo, **p≤0.01 vs control adultos de su mismo sexo y *p≤0.05 vs control de su mismo sexo. ###p≤0.01 vs jóvenes control de machos y de hembras.

2.4.5 Evaluación de marcadores de proliferación y daño oxidativo al DNA en histologías de colon

Debido a que se observó un engrosamiento de las capas mucosa y muscular del colon principalmente, hipotetizamos que existía un aumento de la proliferación celular que ocasionaba el incremento de la celularidad en estas capas. Para evaluar la proliferación celular, se realizaron inmunofluorescencias de la proteína Ki67, la cual es una proteína nuclear que está directamente relacionada a una mayor proliferación ya que es esencial durante la mitosis (Sun et al., 2018). Por otro lado, ya que se sabe que el E171 puede inducir estrés oxidativo y este a su vez se cree que está asociado con una mayor proliferación celular, se evaluó el daño oxidativo al DNA por medio de la inmunolocalización de la molécula 8-oxo, que es el principal producto de la oxidación del DNA. Adicionalmente, los altos niveles de tinción nuclear se encuentran en las células epiteliales normales, mientras que los altos niveles de tinción citoplasmática son evidentes en las células epiteliales tumorales (Matosevic et al., 2015). Las imágenes representativas del tejido marcado en el que se encuentra marcado en color azul los núcleos y los anticuerpos correspondientes para Ki67 (verde), 8-oxo (rojo) se muestran en la **figura 2.7A**, mientras que la cuantificación de la fluorescencia de Ki67 y de 8-oxo se muestra en la **figura 2.7 B y C** respectivamente. La fluorescencia de Ki67 incrementó 27% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.001$) y 42% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.001$) en ratones macho adultos y hembras adultas administradas con E171 respectivamente mientras que los ratones jóvenes no presentaron diferencias significativas al ser administrados con E171. La fluorescencia de 8-oxo incrementó 48% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.001$) en ratones adultos administrados con E171 en comparación de los ratones adultos control. Mientras que los demás grupos no presentaron diferencias significativas en comparación de sus respectivos controles.

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA



COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS EN RATONES JÓVENES Y ADULTOS, MACHOS Y HEMBRAS AL SER ADMINISTRADOS CON E171 DE MANERA SUBCRÓNICA

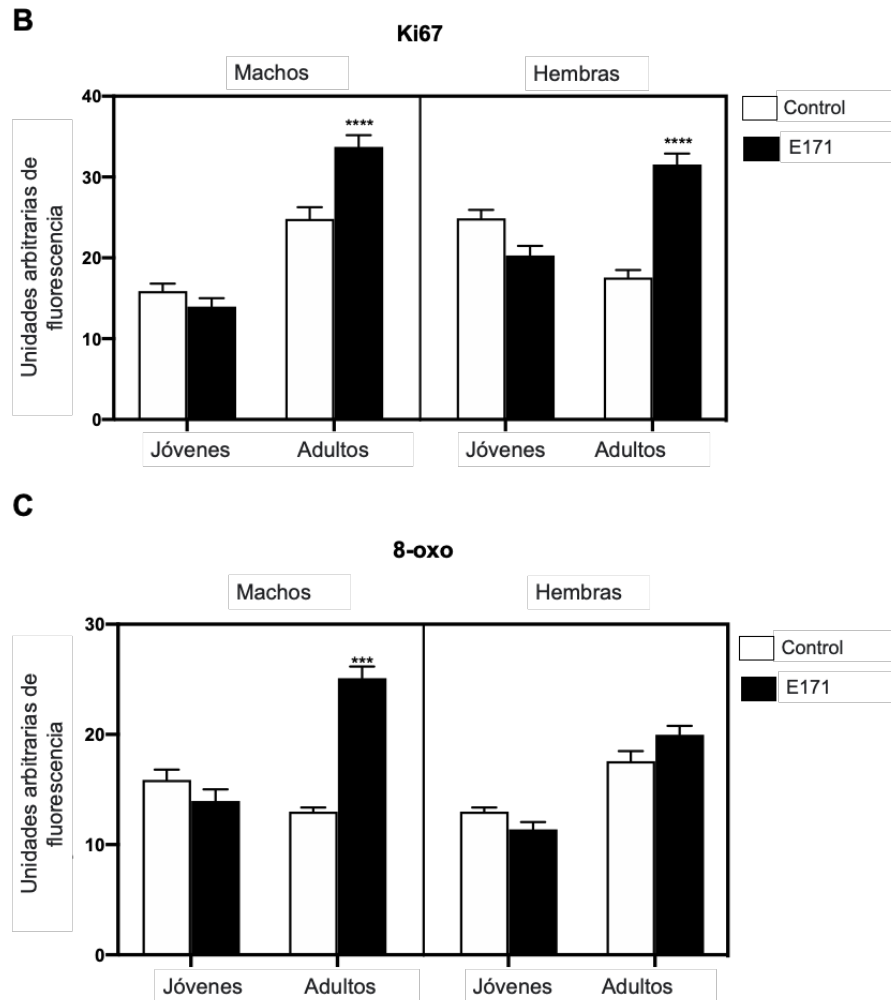


FIGURA 2.7. Proliferación y daño oxidativo al DNA en cortes histológicos de colon

La cuantificación de la fluorescencia fue realizada en imágenes tomadas por medio de microscopía confocal. A) Las imágenes representativas del tejido marcado en el que se encuentra marcado en color azul los núcleos y los anticuerpos correspondientes para Ki67 (verde), 8-oxo (rojo). B) Además, se cuantificó la fluorescencia del anticuerpo para Ki67 y la fluorescencia para C) 8-oxo y se reportó como unidades arbitrarias de fluorescencia (Fluorescencia U.A.). Las cuantificaciones fueron realizadas en imágenes con un aumento del 63x. **** $p \leq 0.0001$ vs control adultos de su mismo sexo, *** $p \leq 0.001$ vs control adultos de su mismo sexo.

2.5 DISCUSIÓN

Se monitoreó el peso de los ratones, así como su consumo de alimento y agua a través de los 90 días de tratamiento y no se encontraron diferencias significativas. El E171 tampoco modificó el peso de los órganos al final del tratamiento, sin embargo, en los ratones macho tanto jóvenes como adultos se observó un aumento de peso total al finalizar el tratamiento. Al analizar la permeabilidad intestinal, por medio de la absorción de un completo de FITC-Dextran en el suero de los ratones, se observó un aumento de la permeabilidad en los ratones adultos machos y hembras. Esto es de importancia ya que se ha visto que, pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino, se muestran variaciones en los componentes especializados de la barrera mucosa, desde la composición de la capa de moco hasta las moléculas de adhesión que regulan la permeabilidad paracelular. Estas alteraciones pueden representar una disfunción primaria en la enfermedad de Crohn, pero también pueden perpetuar la inflamación mucosa crónica en la colitis ulcerosa que eventualmente puede derivar en procesos carcinogénicos. En la práctica clínica, varios estudios han documentado que los cambios en la permeabilidad intestinal pueden predecir el curso de la enfermedad (Michielan et al., 2015). Este aumento en la permeabilidad intestinal puede ser atribuido al aumento de celularidad observado en las histologías de colon e íleon. En estas histologías se cuantificó la capa de la mucosa y la capa muscular y se observó un aumento en el grosor en ratones macho y hembras adultas, siendo mayor en los ratones macho y hembras adulto. Este aumento en el grosor de estas capas podría significar un aumento en la superficie de absorción. Además, en ratones macho y hembras adultas administrados con E171 se encontró un aumento de la proliferación cuantificada con la proteína Ki67 lo que se relaciona al engrosamiento de las capas del epitelio colónico y lo que podría indicar que a un mayor plazo es posible la formación de adenomas (Sun et al., 2018). Por otro lado, se observó un aumento de 8-oxo lo que indica una mayor oxidación del DNA en ratones macho adultos administrados con E171 lo cual indica que podrían ser más propensos a mutaciones ocasionadas por daño oxidativo además de que el aumento de 8-oxo está relacionado a una peor prognosis en casos de cáncer colorectal (Matosevic et al., 2015). Estos resultados sugieren que los ratones adultos

podrían ser más susceptibles a presentar alteraciones en el tracto gastrointestinal debido al consumo subcrónico de E171 en concentraciones relevantes al consumo humano.

2.6 CONCLUSIONES

Los ratones adultos macho y hembras presentan una incrementada permeabilidad intestinal tras la administración con E171 por 3 meses.

Los ratones macho y hembras adultas presentan un engrosamiento de las capas muscular y mucosa del colon tras la administración de E171 por 3 meses.

Los ratones macho y hembras adultas presentan un engrosamiento de la capa mucosa del íleon tras la administración con E171 por 3 meses.

La administración de E171 por 3 meses en ratones adultos, aumenta la proliferación y la presencia de 8-oxo, un producto de la oxidación del DNA.

Los ratones adultos son más susceptibles al consumo de E171 que los ratones jóvenes.

2.7 REFERENCIAS

1. Barreau, F., Tisseyre, C., Ménard, S., Ferrand, A., & Carriere, M. (2021). Titanium dioxide particles from the diet: involvement in the genesis of inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *Particle and Fibre Toxicology*, 18(1). <https://doi:10.1186/s12989-021-00421-2>
2. Blevins, L. K., Crawford, R. B., Bach, A., Rizzo, M. D., Zhou, J., Henriquez, J. E., Khan, D., Sermet, S., Arnold, L. L., Pennington, K. L., Souza, N. P., Cohen, S. M., & Kaminski, N. E. (2019). Evaluation of immunologic and intestinal effects in rats administered an E171-containing diet, a food grade titanium dioxide (TiO₂). *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 133, 110793. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110793>
3. EFSA Journal. (2016). Re-evaluation of titanium dioxide (E171) as a food additive;14(9):4545. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4545>
4. Geiser, M., & Kreyling, W. G. (2010). Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Particle and fibre toxicology*, 7, 2. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-2>
5. Geiss, O., Bianchi, I., Senaldi, C., Bucher, G., Verleysen, E., Waegeneers, N., Brassinne, F., Mast, J., Loeschner, K., Vidmar, J., Aureli, F., Cubadda, F., Raggi, A., Iacoponi, F., Peters, R., Undas, A., Müller, A., Meinhardt, A. K., Walz, E., Gräf, V., ... Barrero-Moreno, J. (2021). Particle size analysis of pristine food-grade titanium dioxide and E 171 in confectionery products: Interlaboratory testing of a single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry screening method and confirmation with transmission electron microscopy. *Food control*, 120, 107550. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107550>
6. Girigoswami K. (2018). Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles. *Advances in experimental medicine and biology*, 1048, 99-122. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72041-8_7
7. Grasso, A., Ferrante, M., Zuccarello, P., Filippini, T., Arena, G., Fiore, M., Cristaldi, A., Conti, G. O., & Copat, C. (2020). Chemical Characterization and Quantification of Titanium Dioxide Nanoparticles (TiO₂-NPs) in Seafood by Single-Particle ICP-MS: Assessment of

- Dietary Exposure. *International journal of environmental research and public health*, 17(24), 9547. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249547>
8. Jani, P. U., McCarthy, D. E., & Florence, A. T. (1994). Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 105(2), 157-168: doi:10.1016/0378-5173(94)90461-8
 9. Kreyling, W. G., Holzwarth, U., Schleh, C., Kozempel, J., Wenk, A., Haberl, N., Hirn, S., Schäffler, M., Lipka, J., Semmler-Behnke, M., & Gibson, N. (2017). Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats: Part 2. *Nanotoxicology*, 11(4), 443-453. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1306893>
 10. Lamas, B., Martins Breyner, N., & Houdeau, E. (2020). Impacts of foodborne inorganic nanoparticles on the gut microbiota-immune axis: potential consequences for host health. *Particle and fibre toxicology*, 17(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00349-z>
 11. Matosevic, P., Klepac-Pulanic, T., Kinda, E., Augustin, G., Brcic, I., & Jakic-Razumovic, J. (2015). Immunohistochemical expression of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in cytoplasm of tumour and adjacent normal mucosa cells in patients with colorectal cancer. *World journal of surgical oncology*, 13, 241. <https://doi.org/10.1186/s12957-015-0667-6>
 12. Martins, C., Alvito, P., & Assunção, R. (2022). Nanomaterials in Foods and Human Digestion: An Important Layer in the Assessment of Potential Toxic Effects. *Advances in experimental medicine and biology*, 1357, 403-414. https://doi.org/10.1007/978-3-030-88071-2_16
 13. Medina-Reyes, E. I., Delgado-Buenrostro, N. L., Díaz-Urbina, D., Rodríguez-Ibarra, C., Déciga-Alcaraz, A., González, M. I., Reyes, J. L., Villamar-Duque, T. E., Flores-Sánchez, M. L., Hernández-Pando, R., Mancilla-Díaz, J. M., Chirino, Y. I., & Pedraza-Chaverri, J. (2020). Food-grade titanium dioxide (E171) induces anxiety, adenomas in colon and goblet cells hyperplasia in a regular diet model and microvesicular steatosis in a high fat diet model. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British*

- Industrial Biological Research Association, 146, 111786.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111786>
14. Michielan, A., & D'Inca, R. (2015). Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators of inflammation*, 2015, 628157. <https://doi.org/10.1155/2015/628157>
15. Pele, L. C., Thoree, V., Bruggraber, S. F., Koller, D., Thompson, R. P., Lomer, M. C., & Powell, J. J. (2015). Pharmaceutical/food grade titanium dioxide particles are absorbed into the bloodstream of human volunteers. *Particle and fibre toxicology*, 12, 26. <https://doi.org/10.1186/s12989-015-0101-9>
16. Peters, R. J., van Bommel, G., Herrera-Rivera, Z., Helsper, H. P., Marvin, H. J., Weigel, S., Tromp, P. C., Oomen, A. G., Rietveld, A. G., & Bouwmeester, H. (2014). Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(27), 6285-6293. <https://doi.org/10.1021/jf5011885>
17. Peters, R., Oomen, A. G., van Bommel, G., van Vliet, L., Undas, A. K., Munniks, S., Bleys, R., Tromp, P. C., Brand, W., & van der Lee, M. (2020). Silicon dioxide and titanium dioxide particles found in human tissues. *Nanotoxicology*, 14(3), 420-432. <https://doi.org/10.1080/17435390.2020.1718232>
18. Pinget, G., Tan, J., Janac, B., Kaakoush, N. O., Angelatos, A. S., O'Sullivan, J., Koay, Y. C., Sierro, F., Davis, J., Divakarla, S. K., Khanal, D., Moore, R. J., Stanley, D., Chrzanowski, W., & Macia, L. (2019). Impact of the Food Additive Titanium Dioxide (E171) on Gut Microbiota-Host Interaction. *Frontiers in nutrition*, 6, 57. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00057>
19. Proquin, H., Rodríguez-Ibarra, C., Moonen, C., Urrutia Ortega, I. M., Briedé, J. J., de Kok, T. M., van Loveren, H., & Irasema Chirino, Y. (2018). Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis*, 33(3), 267-268. <https://doi.org/10.1093/mutage/gey011>

20. Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127(2), 175-186. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>
21. Urrutia-Ortega, I. M., Garduño-Balderas, L. G., Delgado-Buenrostro, N. L., Freyre-Fonseca, V., Flores-Flores, J. O., González-Robles, A., Pedraza-Chaverri, J., Hernández-Pando, R., Rodríguez-Sosa, M., León-Cabrera, S., Terrazas, L. I., van Loveren, H., & Chirino, Y. I. (2016). Food-grade titanium dioxide exposure exacerbates tumor formation in colitis associated cancer model. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 93, 20-31. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.014>
22. Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., & von Goetz, N. (2012). Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental science & technology*, 46(4), 2242-2250. <https://doi.org/10.1021/es204168d>
23. Woting, A., & Blaut, M. (2018). Small Intestinal Permeability and Gut-Transit Time Determined with Low and High Molecular Weight Fluorescein Isothiocyanate-Dextrans in C3H Mice. *Nutrients*, 10(6), 685. <https://doi.org/10.3390/nu10060685>
24. Yang, Y., Doudrick, K., Bi, X., Hristovski, K., Herckes, P., Westerhoff, P., & Kaegi, R. (2014). Characterization of food-grade titanium dioxide: the presence of nanosized particles. *Environmental science & technology*, 48(11), 6391-6400. <https://doi.org/10.1021/es500436x>

CAPÍTULO 3

LA ACUMULACIÓN DE DIÓXIDO DE TITANIO DE GRADO ALIMENTICIO PROVOCA
ALTERACIONES CELULARES QUE PERSISTEN AÚN REMOVIENDO LA EXPOSICIÓN

3.1 JUSTIFICACIÓN

Además de los efectos observados en el colon de ratones, existe la pregunta de los mecanismos por los que el E171 podría inducir alteraciones celulares incluso cuando la exposición es suspendida basado en el hecho de que Francia prohibió el uso de E171 en 2020, y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) indicó que E171 ya no podía considerarse seguro cuando se usa como aditivo alimentario (EFSA, 2021) y el hecho de que el E171 podría ser retenido en las células porque no se metaboliza (Lammel et al., 2019). Actualmente, la preocupación por los efectos adversos del E171 ha ido en aumento debido a que se ha determinado que no se puede asegurar que no sea genotóxico ya que causa la formación de micronúcleos en una línea celular de cáncer de colon (HTC116) (Proquin et al., 2017). Hipotetizamos que el estrés oxidativo podría ser un mecanismo de genotoxicidad, pero la interacción directa entre las partículas de E171 y el ADN u orgánulos subcelulares como los microtúbulos no puede ser descartada (Hou et al., 2019). Además, planteamos la hipótesis de que la exposición a E171 causa alteraciones celulares en las células del colon a través de la internalización de E171 y la formación de ROS que podrían permanecer incluso si se suspende la exposición.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la capacidad de las células para restaurar las alteraciones celulares en la granularidad celular, las huellas dactilares moleculares de los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos, la producción de ROS, la posible interacción con el núcleo celular, el daño del ADN, la actividad de las enzimas antioxidantes y la arquitectura del citoesqueleto en células de colon expuestas a E171 por 24 h.
- Evaluar la capacidad de las células de retener el E171 y revertir las alteraciones causadas por la exposición a este aditivo cuando esta es retirada por 48 h.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Caracterización del E171

El TiO_2 de grado alimenticio (E171) se obtuvo de Sensient Colors México. Las imágenes de las partículas E171 se obtuvieron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM; JEOL JEM 1010, Japón). Los medios de cultivo celular incluyeron medios McCoy 5a (In Vitro, ME-042) suplementados con suero bovino fetal al 10 % (FBS; Biowest, US1520) y antibiótico-antimicótico al 1% (In Vitro, A-07). Para identificar la fase cristalina del E171, se analizaron los espectros Raman (espectrómetro Almega XR Raman; Allentown PA, EE. UU.) en la región espectral entre 300 y 2000 cm^{-1} . Se utilizó un microscopio Olympus (100 y 0,90 NA: apertura numérica) para enfocar el láser en muestras sólidas y para recoger la luz dispersada en una configuración de retrodispersión de 180°C. Además, los espectros Raman se acumularon durante 25 s con una resolución de $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$, la fuente de excitación fue una radiación de 532 nm de un láser Nd:YVO 4 (frecuencia duplicada) y la potencia del láser en la muestra fue de 2.5 mW. El tamaño hidrodinámico, potencial zeta y el índice de polidispersión se midieron mediante dispersión de luz dinámica en un analizador Zeta Plus (Brookhaven, NY, EE. UU.). Con este fin, se dispersaron 1000 μg de E171 en 1 mL de medio de cultivo celular y sonicaron a 60 Hz durante 30 min. Se realizaron diluciones en medio de cultivo celular alcanzando concentraciones de 100 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y también se caracterizaron. Para analizar las ROS intrínsecas producidas por E171 en ausencia de luz, las partículas se suspendieron en un medio de cultivo celular y se midieron mediante el ensayo de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) modificado de Natarajan et al., 2015. Brevemente, el E171 fue incubado a 37°C durante 24 h en medio de cultivo celular en un rango de concentraciones (0-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Como control positivo se añadió peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al medio de cultivo celular alcanzando una concentración final de 10 mM. Luego, la producción de ROS se cuantificó mediante la oxidación de DCFH-DA, que emite fluorescencia. La fluorescencia se cuantificó utilizando un lector de fluorescencia FLx800™ (Agilent BioTek) a una longitud de onda de excitación de 486 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm (Venkatachari et al., 2005). Brevemente, se mezclaron 0.5 mL de DCFH-DA 1 mM (Cayman Chemicals, 85155) en alcohol etílico con 2 mL de NaOH 0.01 N y se incubó a temperatura ambiente durante 30

min y se neutralizó con 10 mL de solución salina tamponada con fosfatos (PBS). Antes del análisis, se añadió peroxidasa de rábano picante (HRP; Sigma-Aldrich, P8375) a la solución DCFH-DA. Estos resultados se reportan como media \pm error estándar de unidades arbitrarias (AU) de fluorescencia. Además, para analizar la actividad fotocatalítica de E171 bajo luz ultravioleta, realizamos el ensayo de azul de metileno (Xu et al., 2014). Se suspendió E171 (1 mg/mL) en azul de metileno (0.05 mM). La solución se mantuvo en agitación constante y se irradió con luz UVC de 30 W (100-290 nm) durante 30, 60, 90 y 120 min. Las soluciones en cada momento se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min para eliminar partículas y se leyeron en un espectrofotómetro (Epoch™ 1209169, BioTek) a una longitud de onda de 664 nm cada 30 min. Los resultados se reportan como medios de absorbancia de azul de metileno.

3.3.2 Cultivos y tratamientos de células de colon

La línea celular de cáncer de colon humano (HCT116) se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) y se mantuvo en medio de cultivo celular y a 37°C en una atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO₂. Para la exposición al cultivo celular, se dispersó un stock de 1 mg de E171 en 1 mL de medio de cultivo celular y se sonicó en un baño de agua a 60 Hz durante 30 min. En este modelo, los cultivos celulares se expusieron a E171 a 0, 1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 h y se evaluaron las alteraciones celulares. Luego, otro conjunto de cultivos celulares se expuso a E171 usando las mismas concentraciones mencionadas anteriormente durante 24 h, se eliminó el E171 de los cultivos celulares y estos se mantuvieron durante 48 h más en medio de cultivo celular sin E171 (48 h post-exposición a E171). Se evaluaron los mismos parámetros en ambos conjuntos de cultivos celulares.

3.3.3 Viabilidad celular

Utilizamos concentraciones no citotóxicas en nuestros experimentos, asegurándonos así de que las alteraciones celulares no fueran inducidas por procesos de muerte celular. La viabilidad celular se evaluó mediante la técnica del azul de tripano (Strober, 2015). Brevemente, las células expuestas a E171 como se describió anteriormente, se recolectaron con tripsina al 0,05% (In Vitro S.A., EN-008) y se centrifugaron a 1500 rpm. Después, las células se

resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo celular y se diluyeron en una proporción de 1:10 en una solución de azul de tripano al 10 % (In Vitro S.A., SR-15, México). Las células vivas, que no se tiñeron con azul de tripano, se contaron en una cámara de Neubauer. El recuento de células se normalizó con respecto al control y se reportó como un porcentaje de células vivas en comparación con el control. Los datos se presentan como media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

3.3.4 Cuantificación de la internalización de E171

La internalización de E171 en cultivos celulares se analizó por el contenido de titanio utilizando un espectrómetro de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Brevemente, se expusieron 3×10^6 células a E171 como se describe anteriormente. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS y se recolectaron con tripsina al 0.05%, las células se centrifugaron a 1500 rpm y se congelaron a -80 °C. Se pesó el sedimento celular y las muestras se digirieron con H_2O_2 y HNO_3 en proporciones 1:9 en un sistema de microondas ajustado a 1200 MV de potencia y calentado durante 15 min a 150 °C seguido de 15 min a 180 °C y 100 min a 180 °C. El contenido de titanio en las muestras se analizó en un espectrómetro ICP-MS (equipo Agilent Technologies 7900) y se calibró con una curva de 1 a 5 ppm de titanio. Los rangos mínimos de detección y contenido de titanio de las muestras se analizaron por triplicado. El contenido de titanio se informa como concentración de titanio en las células (ppm). Los datos se presentan como media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

3.3.5 Análisis de granularidad celular

La granularidad de las células se evaluó como un indicador indirecto de la internalización de E171 en las células y se evaluó mediante citometría de flujo según lo descrito por Verma et al., 2018. Brevemente, las células se expusieron a E171 como se describe anteriormente, se lavaron con solución salina equilibrada de Hanks, y se cosechó con 0.05% de tripsina. Luego, las células se fijaron en etanol frío (70%) y se almacenaron a 4 °C durante 24 h; después de la

fijación, las muestras se lavaron con PBS tres veces y se suspendieron en FACS Flow (BD Biosciences, 342003). Las muestras se analizaron por citometría de flujo en un citómetro FACScalibur (BD BIOSCIENCES) y se leyeron 10.000 eventos. Se muestran parcelas representativas. La granularidad se informa como porcentaje de células granulares y los datos se presentan como media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

3.3.6 Cuantificación de ROS en células expuestas

Para analizar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células después de la exposición a E171 y después de la eliminación de E171, se cuantificó el ROS total mediante el ensayo DCFH-DA modificado de Natarajan et al., 2015. Se agregaron medio de cultivo celular y DCFH-DA a las células a una concentración final de 1 nM. Como control positivo, se añadió H₂O₂ (200 μ M) a las células durante 24 h y 24 h seguidas de 48 h de incubación con medio de cultivo sin E171 (48 h post-exposición a E171). Las células con DCFH-DA se incubaron durante 60 min y se leyó la fluorescencia utilizando un lector de fluorescencia FLx800™ (Agilent BioTek) a una longitud de onda de excitación de 486 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. La producción de ROS se informa como el porcentaje de fluorescencia en comparación con el control. Los datos se presentan como media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

3.3.7 Actividad de enzimas antioxidantes: GR, GPx y catalasa

Para analizar la actividad de las principales enzimas antioxidantes glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa de las células como respuesta a la producción de ROS, las células se recolectaron después de la exposición a E171 con TrypLE™ Express (ThermoFischer, 12604013) y se suspendieron en buffer de fosfato pH 7, después, las células se sonicaron para un minuto y se centrifugó durante 12 min a 12000 rpm para obtener proteínas totales. La concentración de proteína se cuantificó mediante la técnica de Bradford (ThermoFischer, 23236).

- a) La actividad de GPx se cuantificó indirectamente mediante una reacción acoplada con GR y se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NADPH. La mezcla de reacción se preparó agregando GR, y se siguió el método descrito a continuación para cuantificar. Las absorbancias se cuantificaron a 340 nm cada minuto durante 3 min y se multiplicaron por la absorción milimolar de NADPH a 340 nm que es 0.16, se dividieron entre los mg de proteína obtenidos por muestra, y los datos se presentan como porcentaje de U/mg de proteína (donde 1 U=1 μ mol de NADPH oxidado/min). Los porcentajes se calcularon utilizando el control de cada tiempo como 100%. Los datos se presentan como media \pm error estándar de tres experimentos independientes.
- b) La actividad de GR se cuantificó por el método de Carlberg y Mannervik (1975), en el que la desaparición de NADPH a 340 nm de una mezcla de reacción que contenía glutatión oxidado (GSSG), EDTA, NADPH y el lisado de células expuestas a E171. La mezcla de reacción contiene buffer de fosfato 0.1 M, pH 7.6, EDTA 0.5 mM, GSSG 1.25 mM y NADPH 0.1 mM. Las absorbancias se cuantificaron y se procesaron los datos como lo indicado en el inciso a). Los datos se presentan como media \pm error estándar de tres experimentos independientes.
- c) La medición de la actividad de la catalasa se basa en la disminución de la absorbancia de H₂O₂ debido a su degradación por la catalasa presente en la muestra según el método de Aebi (1982), se agregaron 10 μ L de H₂O₂ al 30% al homogeneizado de proteína en 10 buffer fosfato mM pH 7, y se leyó la absorbancia a 240 nm cada 15 segundos durante 30 segundos. Finalmente, la constante de reacción se dividió por la cantidad de proteína utilizada en la prueba. Los resultados se reportan como el porcentaje de κ /mg de proteína (donde κ es la constante de velocidad de primer orden, que tiene unidades de 1/s). Los porcentajes se calcularon utilizando el control de cada tiempo como 100%. Los datos se presentan como media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

3.3.8 Análisis de huellas moleculares de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos

La evaluación de los cambios en las huellas dactilares moleculares de las células expuestas a E171 y las alteraciones persistentes después de eliminar la exposición a E171 de las células se analizaron mediante espectroscopia infrarroja transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) en el rango espectral de 4000-800 cm^{-1} (Wang et al., 2020). Después de la exposición a E171 como se describió anteriormente, las células se recogieron y se lavaron dos veces con PBS y se suspendieron en solución salina (0.9 % de NaCl). Luego, se depositaron 4 μL de suspensión celular y se secaron en un cristal ATR-FTIR. Los espectros sin procesar se normalizaron utilizando el software UNSCRAMBLER X10.3 CAMO como se informó anteriormente (Vazquez-Zapien et al., 2016). El espectro derivado de 240 adquisiciones de datos y la absorbancia de las bandas espectrales se expresa como número de onda cm^{-1} . Las áreas de los picos correspondientes a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos se especifican en la **tabla 3.1** y se seleccionaron y analizaron según lo descrito por Talari et al., 2017 y Wang et al., 2020. Áreas bajo la curva para proteínas, lípidos y ácidos nucleicos se calcularon y normalizaron con GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los resultados se muestran como área bajo la curva de absorbancia/longitud de onda. Los datos se presentan como media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

TABLA 3.1. Regiones analizadas mediante ATR-FTIR

	Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación*
Proteínas	3294	Estiramiento de N-H de amida A
	3067	Estiramiento de N-H de amida A
	1652	Amida I y cambios conformacionales en proteínas
	1545	Amida II y cambios conformacionales en proteínas
	1313	A-helice de la amida III
Ácidos nucleicos	1243	Estiramiento del PO ²⁻
	1084	Enlaces fosfodiéster del esqueleto de azúcar fosfato de los ácidos nucleicos
Lípidos	1451	Deformación de metileno
	1399	Flexión de metilo de lípidos

ATR-FTIR: Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier de reflexión total atenuada.

*Talari et al., (2017) y Wang et al., (2020)

3.3.9 Localización intracelular de partículas de E171

Para analizar la localización y la interacción de las partículas de E171 con el núcleo, los núcleos se tiñeron y las partículas se localizaron por reflectancia de la luz. Se obtuvieron imágenes de las células después de la exposición a E171. Brevemente, las células se fijaron con acetona fría durante 15 min, se lavaron con PBS 1x y se incubaron con Hoechst 33342 para detectar el núcleo (1:1000, Life Technologies, 62249) a temperatura ambiente durante 1.5 h en la oscuridad. El núcleo se cuantificó después de 24 h de exposición a E171 y 48 h después de retirar la exposición a E171. Las imágenes a 63x y las imágenes de Z-stack se obtuvieron

mediante microscopía confocal (Leica TCS-SP8, Alemania). El área de los núcleos se calculó mediante el software ImageJ y se informa como μm^2 de al menos 300 células por tratamiento. Los datos se presentan como media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

3.3.10 Rupturas de doble cadena medidas como expresión de γH2AX

Para analizar el daño del ADN en las células a medida que se rompe la doble hebra y el daño restante a las 48 h post-exposición a E171, se cuantificó la expresión de γH2AX en proteínas nucleares de las células. La extracción de proteínas nucleares se realizó según lo indicado por Blough et al. (1998) y Hayashi & Faustman (2000) y añadiendo inhibidor de proteasa y fosfatasa (Cocktail (100X); Thermo Scientific, 78440). Las proteínas fueron cuantificadas con el método de ácido bicinonínico y las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Infinite 200 Pro 6305/UV). Para realizar el western blot, se cargaron 10 μg de muestras preparadas con Tris 10 mM pH 7.4 más buffer Laemmli al 95% (Bio-Rad, 161-0737) y 2-mercaptoetanol al 5% (Sigma, M6250) en gel de poliacrilamida-SDS a 15%. Se realizó una corrida electroforética y la transferencia de proteínas a membranas de PVDF utilizando el sistema de transferencia semiseco (Trans-Blot-Turb, Bio-Rad) a un voltaje de 25 V y 1 amperio durante 45 min. La membrana se cortó en la banda de 20 kDa observada utilizando el marcador Precision protein plus (Biorad, 1610374). El bloqueo de la membrana por encima de 20 kDa se realizó con leche descremada al 5 % y el bloqueo de la membrana por debajo de 20 kDa con albúmina al 5%, ambos en TBS-Tween al 0.1 % durante 1 h en agitación. Al finalizar el bloqueo se incubó el anticuerpo primario Anti-Beta-Actina (β -Actina) (1:500, anticuerpo monoclonal donado por el Dr. Manuel Hernández, Cinvestav-IPN) para membrana por encima de 20 kDa y con γH2AX (Ser139) (1:1000, señalización celular, 2577) para la membrana de menos de 20 kDa, ambos anticuerpos se incubaron durante la noche a 4 °C con agitación constante. Al día siguiente, se incubaron los anticuerpos secundarios anti-ratón (1:3000, Amersham, NA931) y anti-conejo (1:3000, Amersham, NA934V), durante 1 h bajo agitación constante. La inmunodetección se realizó utilizando sustrato de quimioluminiscencia de peroxidasa HRP (Millipore, WBKLS0100). Para la visualización y captura de imágenes se utilizó el ChemiDoc-It Imager UVP. Los resultados se reportan como el cambio de pliegue de la expresión de γH2AX dividido por la

expresión de β -actina. Los datos se presentan como media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

3.3.11 Interacción de microtúbulos con partículas de E171 durante la mitosis

La tinción de inmunofluorescencia de tubulina se realizó para analizar la colocación de E171 con tubulina mediante imágenes confocales y se cuantificó la fluorescencia para investigar alteraciones en el citoesqueleto de tubulina. Después de la exposición a E171, las células se lavaron con PBS y se detuvo la mitosis mediante la adición de 4.5 μ g/mL de citocalasina B, que es un compuesto que inhibe la polimerización de actina, pero no afecta a la tubulina, al medio de cultivo celular (Sigma-Aldrich, C6762) durante 24 h. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 1 h y se lavaron tres veces con PBS. Después, las células se permeabilizaron con acetona fría durante 5 min y las áreas de unión inespecífica se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se incubaron con BSA al 1% durante 1 h. Para la tinción de tubulina, las muestras se incubaron con anticuerpo conjugado Alexa Flúor 488 con tubulina α/β (1:1000, Life Technologies, 322588). E171 fue detectado por microscopía confocal de reflectancia que utiliza una luz láser de 830 nm de longitud de onda. Para la tinción del núcleo, las células se incubaron con Hoechst para detectar el núcleo (1:1000, Life Technologies, 62249) a temperatura ambiente durante 1.5 h en la oscuridad. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal (Leica TCS-SP8, Alemania) y la fluorescencia se cuantificó mediante el software LASX Life Science (Leica). Los resultados se muestran como el porcentaje de fluorescencia frente al control. Los datos se presentan como media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

3.3.12 Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes (Ranstam, 2012). Las medias se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía (**figura 3.4A**) o ANOVA de dos vías (**figuras 3.5-3.8 y 3.10-3.13**) seguido de una prueba de comparaciones múltiples para analizar las diferencias entre concentraciones

y tiempos. Los datos fueron analizados y normalizados por GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). Las diferencias de al menos $*p < 0,05$ se consideraron significativas.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Caracterización del E171

E171 se mostró como una partícula amorfa con un tamaño de alrededor de 100 nm (**figuras 3.1A y 3.1B**). La cristalinidad mostró un patrón típico de absorción de fase anatasa (**figura 3.1C**). El tamaño hidrodinámico de E171 en medio de cultivo celular (1 mg/mL) fue de 1333.1 nm ± 2045 nm, los aglomerados más pequeños se midieron cuando el stock se diluyó 1:100 (10 $\mu\text{g/mL}$), presentando un tamaño de 70.78 ± 0.36 nm (**figura 3.1D**). Para medir la producción intrínseca de ROS de E171, se incubó E171 con medio de cultivo celular y se cuantificó ROS mediante el ensayo DCFH-DA que muestra un aumento en la fluorescencia directamente proporcional a la cantidad de ROS. E171 no mostró un aumento en la intensidad de la fluorescencia frente al control cuando se incubó a diferentes concentraciones (0-100 $\mu\text{g/cm}^2$) de E171 con DCFH-DA (**figura 3.2A**), lo que significa que no hubo producción de ROS en ausencia de luz y células. Posteriormente, para caracterizar si E171 pudiese ser fotocatalítico, lo que significa que, si bajo la luz ultravioleta podría generar ROS y degradar cualquier compuesto orgánico como el azul de metileno en el medio, se realizó un ensayo de azul de metileno. E171 disminuyó la concentración de azul de metileno en el medio, lo que se observó como una diferencia (Δ) de 0.1716 de absorbancia la tasa de absorción de azul de metileno contra el tiempo de inicio (**figura 3.2B**), lo que significa que el E171 degradó el azul de metileno en la solución bajo luz ultravioleta.

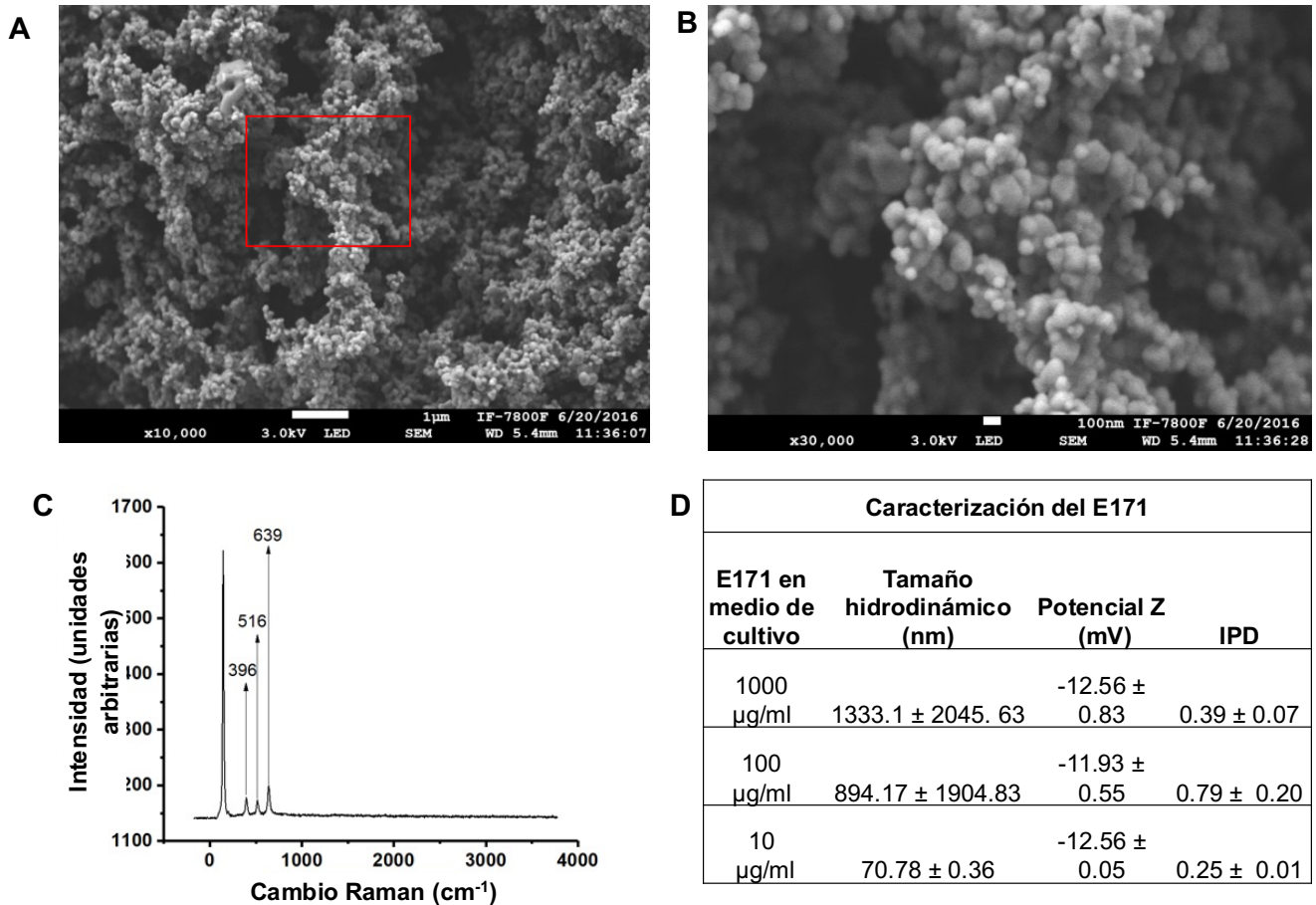


FIGURA 3.1. Caracterización del E171.

A. La microscopía electrónica de barrido muestra la forma de la partícula de E171 (aumento de x10,000), y el cuadrado rojo se seleccionó para un aumento de x30 000. B. La ampliación de las partículas E171 muestra formas irregulares con algunas partículas por debajo de 100 nm (ampliación x30000). C. La fase cristalina de E171 se determinó mediante espectros Raman. D. Se midieron el tamaño hidrodinámico (nm), el potencial Z y el índice de polidispersión (IPD) en medios de cultivo celular. Se muestra la media ±desviación estándar de 3 experimentos independientes.

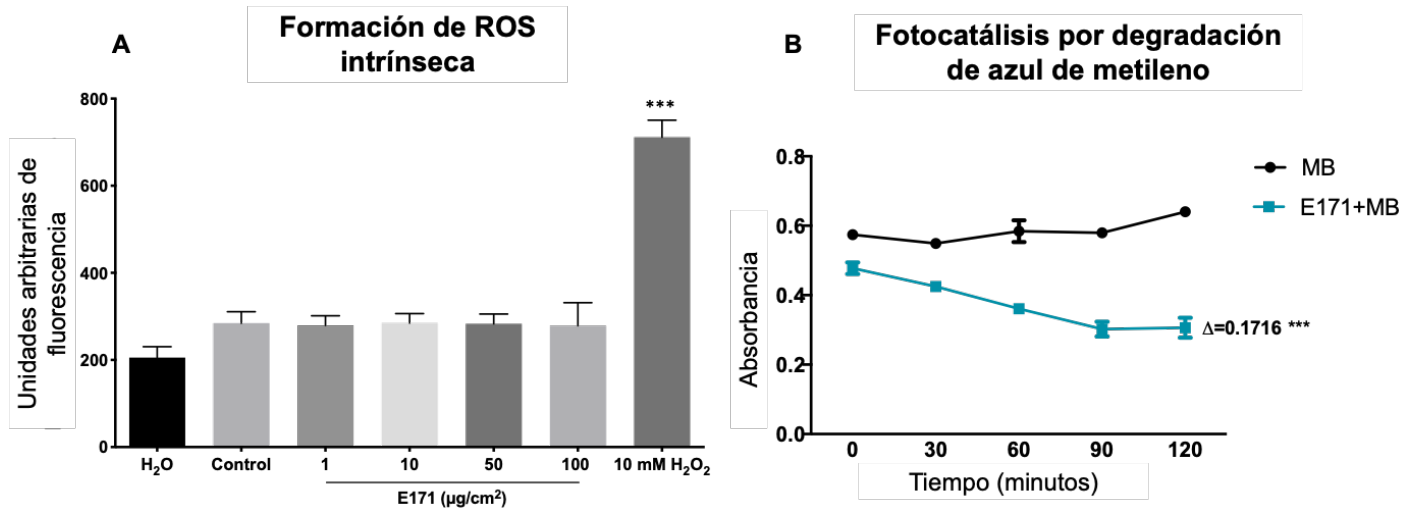


FIGURA 3.2. Formación de ROS intrínseca y capacidad fotocatalítica de E171

A. La formación de ROS intrínseca se cuantificó mediante el ensayo DCFH-DA, en el que se analizó la capacidad de las partículas E171 para formar ROS en un tubo de ensayo, por medio de la intensidad de la fluorescencia. No se observaron diferencias en ninguna de las concentraciones. Como control positivo, se utilizó H₂O₂ 10 mM. *** $p \leq 0.001$ vs control. B. La fotocatalisis de azul de metileno (MB) por E171 se cuantificó como medio de absorbancia a 664 nm, lo que indicó la concentración de MB en la solución. AU: unidades arbitrarias. Se muestra delta entre el tiempo 0 y 120 y *** $p \leq 0.001$ vs MB. Se muestra la media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

3.4.2 Viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó en células de colon expuestas a E171 en diferentes tiempos de exposición para evitar la interferencia de la muerte celular con los resultados de otros criterios de valoración en este estudio. Ninguna de las concentraciones o tiempos disminuyó la viabilidad celular en comparación con las células de control, concluyendo que la viabilidad no se vio afectada por 24 h de exposición a E171 ni después de 48 h después de retirar la exposición a E171 (**figura 3.3**).

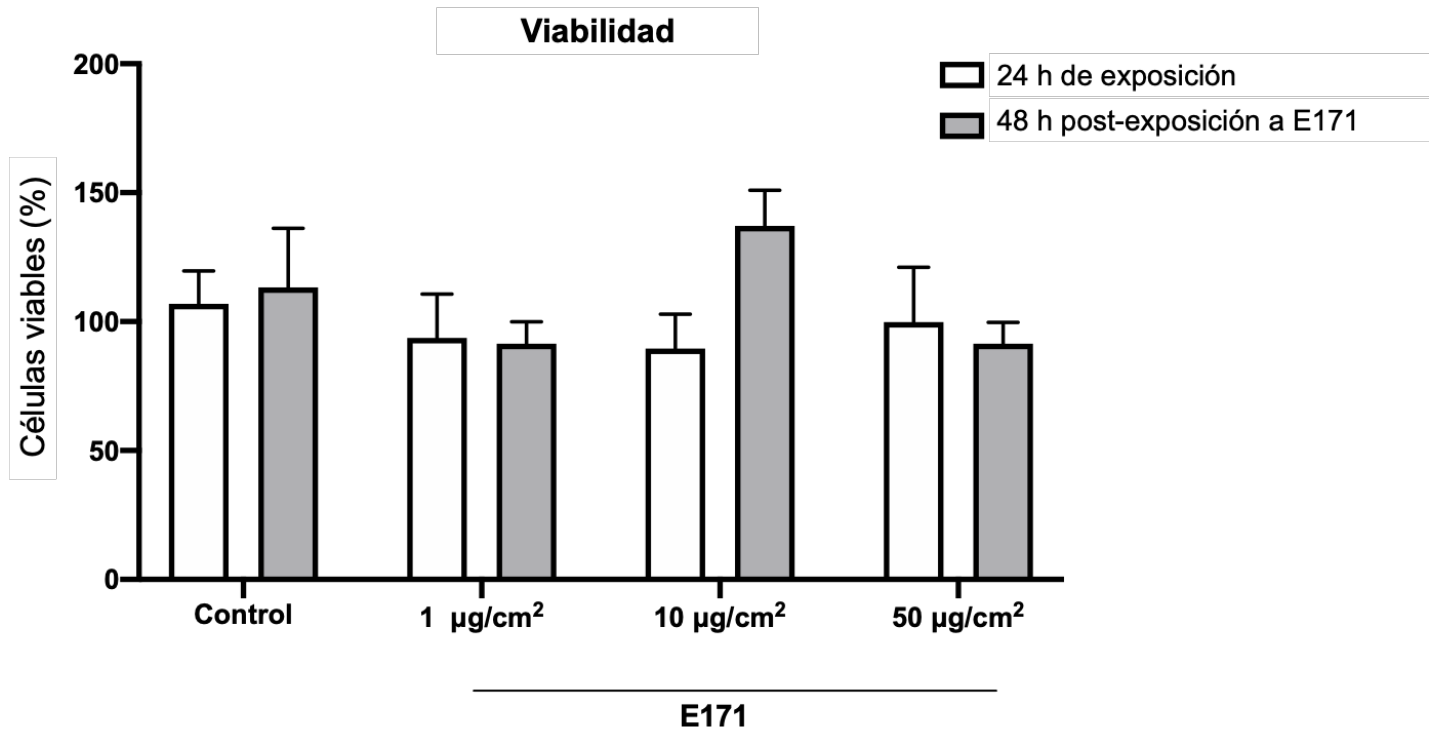


FIGURA 3.3. Análisis de citotoxicidad en células de colon expuestas a E171

Las células se evaluaron mediante ensayo con azul de tripano. Se muestra el porcentaje de células vivas sin diferencias entre tratamientos después de 24 h de exposición (barras blancas) y 48 h post-exposición a E171 (barras grises). En ambos tratamientos, las células se expusieron a 1, 10 y 50 µg/cm². Se muestra la media ±desviación estándar de 3 experimentos independientes.

3.4.3 Contenido de titanio en las células expuestas a E171

La acumulación de titanio en las células y el titanio persistente en las células después de la exposición a E171 se cuantificó mediante ICP-MS. El contenido de titanio en las células después de 24 h de exposición a E171 a 1, 10 y 50 µg/cm² aumentó 3 veces ($\alpha=0.05$, $p=0.99$), 14.9 veces ($\alpha=0.05$, $p=0.69$) y 21 veces ($\alpha=0.05$, $p=0.2891$) respectivamente en comparación con el control. Además, 48 h después de la eliminación de E171, el contenido de titanio en las células expuestas a 1, 10 y 50 µg/cm² aumentó 3 ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.9999$), 12 ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.9999$) y 69 ($\alpha=0.05$, $p=0.0260$) veces respectivamente. No se encontraron diferencias entre los tiempos, lo que sugiere una excitosis limitada de E171 (**figura 3.4**).

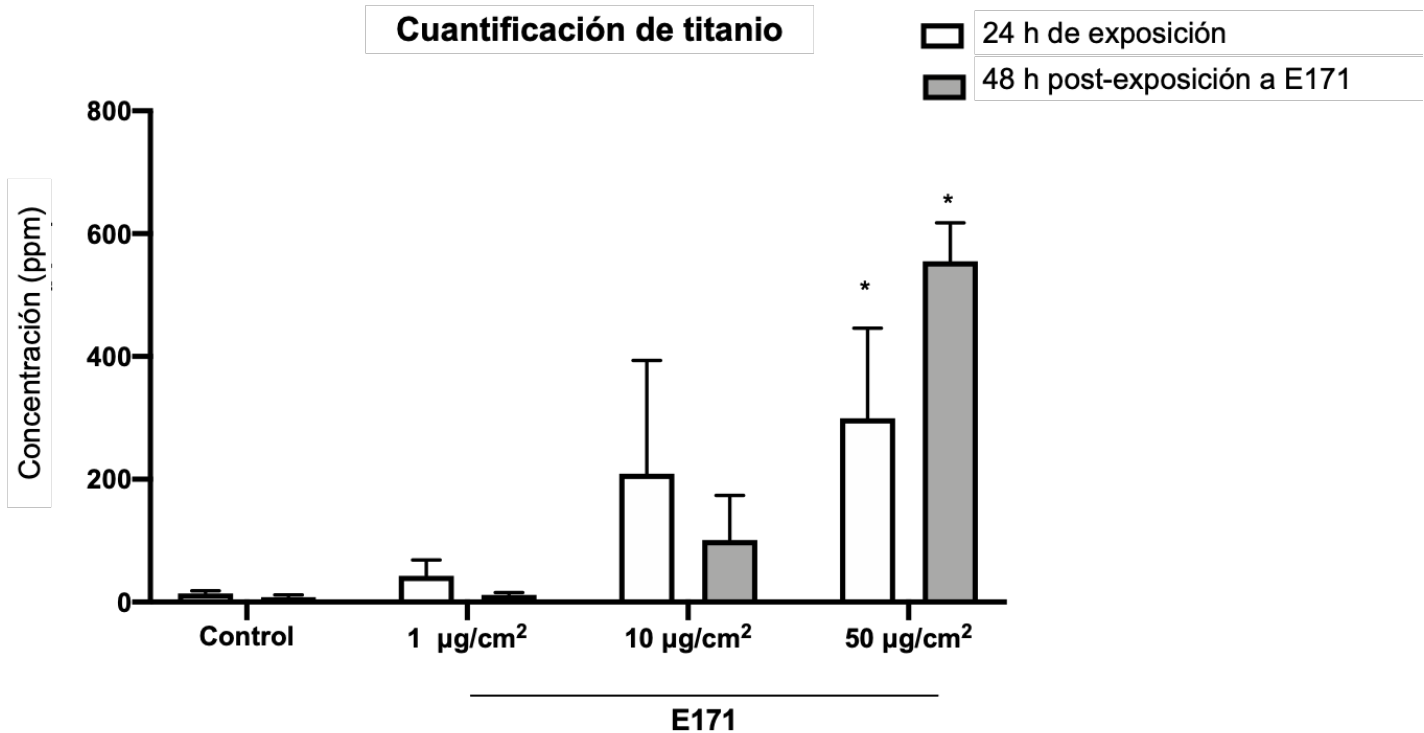


FIGURA 3.4. Cuantificación de titanio por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

La cuantificación de titanio se evaluó mediante ICP-MS en células después de 24 h de exposición a E171 (barras blancas) y 48 h después de la eliminación de E171 (barras grises). ** $p \leq 0.01$ vs control. * $p \leq 0.05$ vs control. Se muestra la media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

3.4.4 Granularidad celular

La granularidad celular se analizó como indicador de la internalización de E171 y como indicador indirecto del contenido de orgánulos dentro de las células. Los gráficos de dispersión mostraron células con mayor granularidad en el cuadrante superior izquierdo de los gráficos (**figura 3.5**) en los que 24 h de exposición a E171 indujeron un aumento en la granularidad celular del 5% ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.1614$), 35% ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.0005$) y 25% ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.0001$) en células expuestas a 1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente. Además, 48 h después de la eliminación de E171, las células expuestas a 1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171 mostraron un aumento en la granularidad del 5% ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.0903$), 18% ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.1519$) y 27% ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.0104$) respectivamente en comparación con el control. La granularidad no mostró

diferencias entre tiempos; por lo tanto, se mantuvo una mayor granularidad 48 h después de retirar la exposición a E171 (*figura 3.6*).

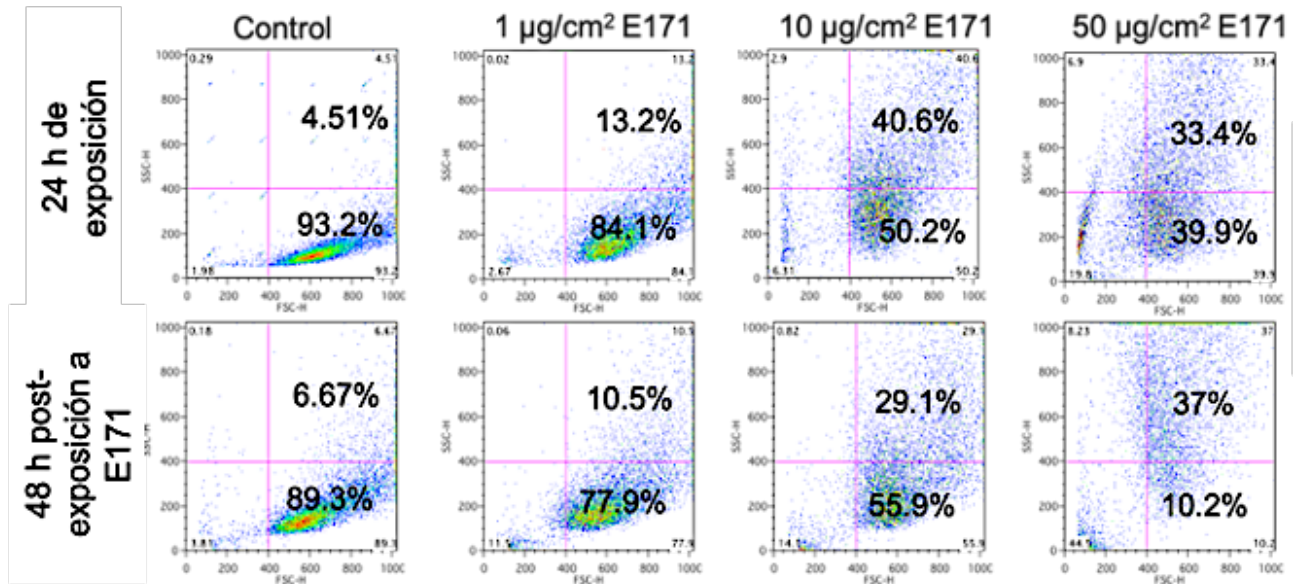


FIGURA 3.5. Gráfica de puntos de análisis por citometría de flujo de granularidad en células de colon expuestas a E171

Se evaluaron 10 000 eventos (células) por tratamiento. Las células con un aumento de granularidad se encuentran cuantificadas en el cuadrante superior derecho. Los porcentajes corresponden a la proporción de células del total que se encuentran en el cuadrante con respecto al total de 10 000 eventos.

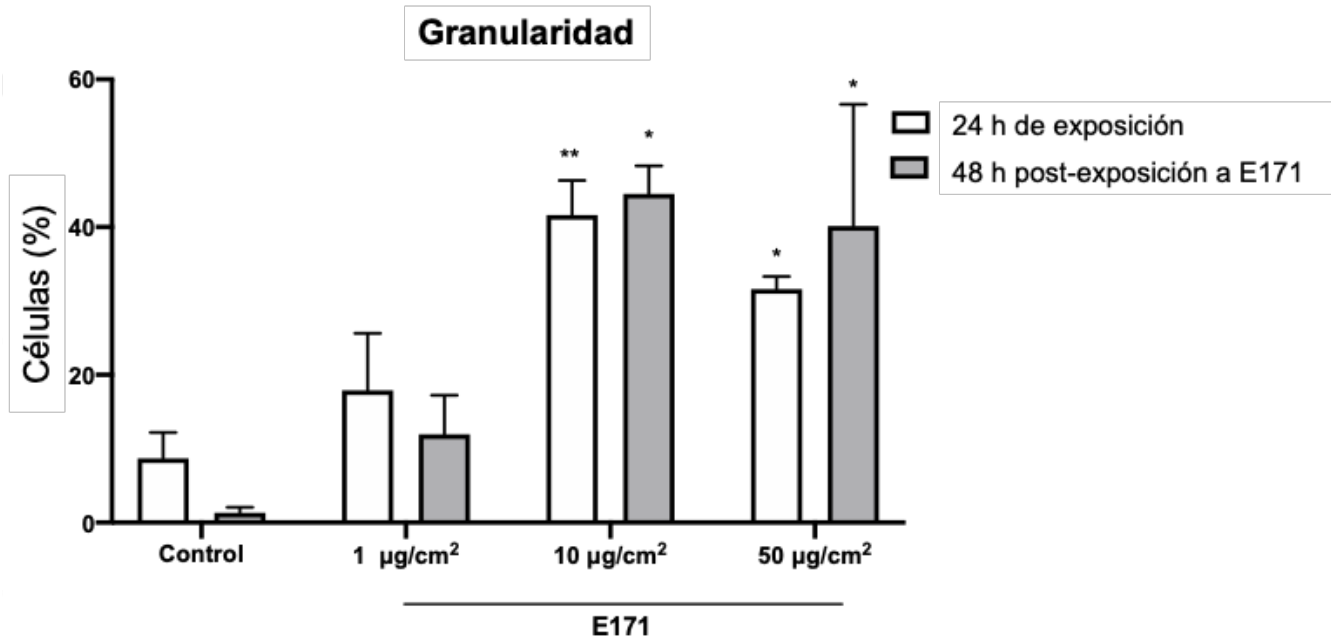


FIGURA 3.6. Cuantificación de células granulares tras la exposición a E171

La granularidad de las células expuestas se evaluó mediante citometría de flujo después de 24 h de exposición a E171 (barras blancas) y a las 48 h post-exposición a E171 (barras grises). En ambos tratamientos, las células se expusieron a 1, 10 y 50 µg/cm². **p<0.01 vs control. *p<0.05 vs control. Se muestra la media ±desviación estándar de 3 experimentos independientes.

3.4.5 Aumento y persistencia de ROS después de la eliminación de la exposición

La producción de ROS en células de colon expuestas a diferentes concentraciones de E171 y en diferentes momentos se analizó mediante el ensayo de oxidación DCFH-DA. En las células expuestas durante 24 h a 1, 10 y 50 µg/cm² respectivamente. Mientras que las células expuestas a 1, 10 y 50 µg/cm² y analizadas 48 h después de la eliminación de E171, el aumento en la producción de ROS fue del 11% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$) 10% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$) y 7% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$) respectivamente. Al comparar los tiempos de exposición, las células analizadas 48 h después de la eliminación de E171, la producción de ROS disminuyó un 5% ($\alpha=0.05$, $p=2.82$), un 10% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0035$) y un 12% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$) en comparación con células expuestas 24 h a 1, 10 y 50 µg/cm² respectivamente. El control positivo (200 µM H₂O₂), aumentó la producción de ROS en las células en un 45% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$) cuando

se expuso durante 24 h y en un 61% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$) cuando se expuso durante 24 h seguido de 48 h de incubación con medio de cultivo fresco (**figura 3.7**). Ambos tratamientos se compararon con células de control.

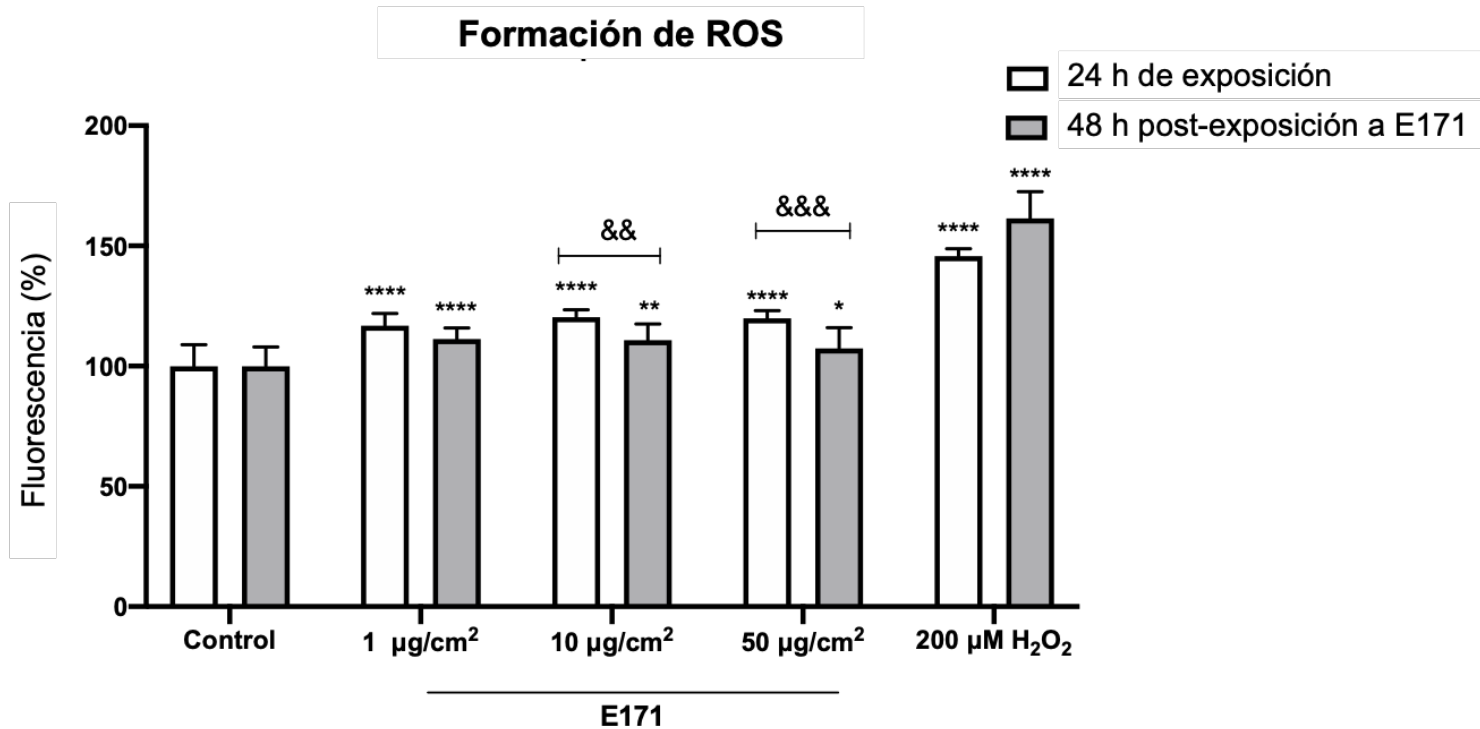


FIGURA 3.7. Cuantificación de la producción de ROS después de la exposición a E171

El total de ROS en las células se cuantificó después de 24 h de exposición a E171 (barras blancas) y 48 h post-exposición a E171 (barras grises). ROS se cuantificó mediante fluorescencia y se normalizó frente al control. En ambos tratamientos, las células se expusieron a 1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Los datos muestran la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs control de su respectivo tiempo, ** $p < 0.01$ vs control de su respectivo tiempo y **** $p < 0.0001$ vs control de su respectivo tiempo, && $p < 0.01$ entre tiempos y &&& $p < 0.001$ entre tiempos.

3.4.6 Actividad de las enzimas antioxidantes

Dado que la producción de ROS se mantuvo durante 48 h después de la eliminación de E171, y para analizar la activación de la respuesta antioxidante, se evaluó la actividad de GR, GPx y catalasa. En cuanto a GR, se observó un aumento del 44% ($\alpha=0.05$, $P\leq 0.0001$) y del 32%

LA ACUMULACIÓN DE DIÓXIDO DE TITANIO DE GRADO ALIMENTICIO PROVOCA ALTERACIONES CELULARES QUE PERSISTEN AÚN REMOVIENDO LA EXPOSICIÓN

($\alpha=0.05$, $P\leq 0.0001$) en la actividad enzimática de GR en células expuestas durante 24 h a 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171 (**tabla 3.2**). Sin embargo, después de 48 h después de la exposición, la actividad enzimática de GR disminuyó 17% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$), 6% ($\alpha=0.05$, $p=0.032$) y 26% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$) en los tratamientos de 1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171 respectivamente al compararlos con su testigo. Además, al comparar los tiempos de exposición, la actividad enzimática de GPx disminuyó 86% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0101$), 66% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0101$) y 50% ($\alpha=0.05$, $p=0.0404$) después de 24 h de exposición a 1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171, pero se recuperó, aumentando un 63%, 39% y 59% respectivamente 48 h después de retirar la exposición a E171 (**tabla 3.2**). La actividad enzimática de la catalasa no mostró diferencias significativas en ninguna de las concentraciones y tiempos ensayados (**tabla 3.2**).

TABLA 3.2. Actividad de enzimas antioxidantes

	24h de exposición				48h post-exposición			
	Control	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Control	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
GR	99.99 \pm 1.68	103.26 \pm 2.92	143.38 \pm 1.74****	131.75 \pm 3.50****	100.55 \pm 0.69	83.19 \pm 2.71####	94.40 \pm 3.02####	74.65 \pm 1.89####
GPx	100.4 \pm 60.17	28.63 \pm 1.62	42.25 \pm 13.87	50.23 \pm 5.69	100.0 \pm 12.45	97.14 \pm 11.42	89.52 \pm 9.18	110.47 \pm 27.00
Cat	99.00 \pm 35.54	117.56 \pm 9.30	95.66 \pm 12.89	81.18 \pm 13.20	100.36 \pm 3.88	81.29 \pm 17.31	82.98 \pm 9.82	89.22 \pm 59.72

Los valores de la actividad de glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa (GPx) se reportan como porcentaje de U/mg de proteína. Los valores de catalasa se expresan como porcentaje de k/mg de proteína. Los porcentajes se calcularon utilizando el control de cada tiempo como 100%. **** $p\leq 0.0001$ vs 24 h de exposición y #### $p\leq 0.0001$ vs control 48 h después de exposición a E171

3.4.7 Huella molecular de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos

La huella molecular de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos después de la exposición de células de colon a E171 se analizó mediante el método ATR-FTIR y los espectros de las regiones de interés (*tabla 3.1*) se muestran en la *figura 3.8*. El área bajo la curva de las regiones proteicas no mostró diferencias significativas (*figura 3.8A*). El área bajo la curva de ácidos nucleicos en células expuestas por 24 h a 1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mostró una disminución significativa de 22% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.001$), 23% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$), y 50% ($\alpha=0.05$, $P\leq 0.0001$) respectivamente. Además, las células expuestas a 1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ analizadas 48 h post-exposición a E171 mostraron una disminución del 5% ($\alpha=0.05$, $p=0.2575$), 36% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$) y 47% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$) respectivamente contra el control (*figura 3.8B*). Todos los tratamientos fueron diferentes entre tiempos y disminuyeron 5%, 9% y 4% al comparar 1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente. Además, el área bajo la curva para la región lipídica disminuyó un 24% ($\alpha=0.05$, $P\leq 0.0001$), 23% ($\alpha=0.05$, $P\leq 0.0001$), 49% ($\alpha=0.05$, $P\leq 0.0001$) después 24 h de exposición a 1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171 respectivamente. Mientras que las células se recuperaron 48 h post-exposición a E171 en concentraciones de 1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mostraron 6% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$), 39% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$) y 45% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$) disminución de la región lipídica del ATR-FTIR. Al comparar entre tiempos, el área bajo la curva para la región de los lípidos en las células expuestas a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ se recuperó aumentando un 18% desde las 24 h de exposición hasta las 48 h post-exposición a E171. Por el contrario, las células expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ disminuyeron un 16% desde las 24 h de exposición a E171 hasta las 48 h después de la eliminación de E171, y las células expuestas a 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aumentaron un 4% al comparar 24 h de exposición con 48 h después de retirar la exposición a E171 (*figura 3.8C*).

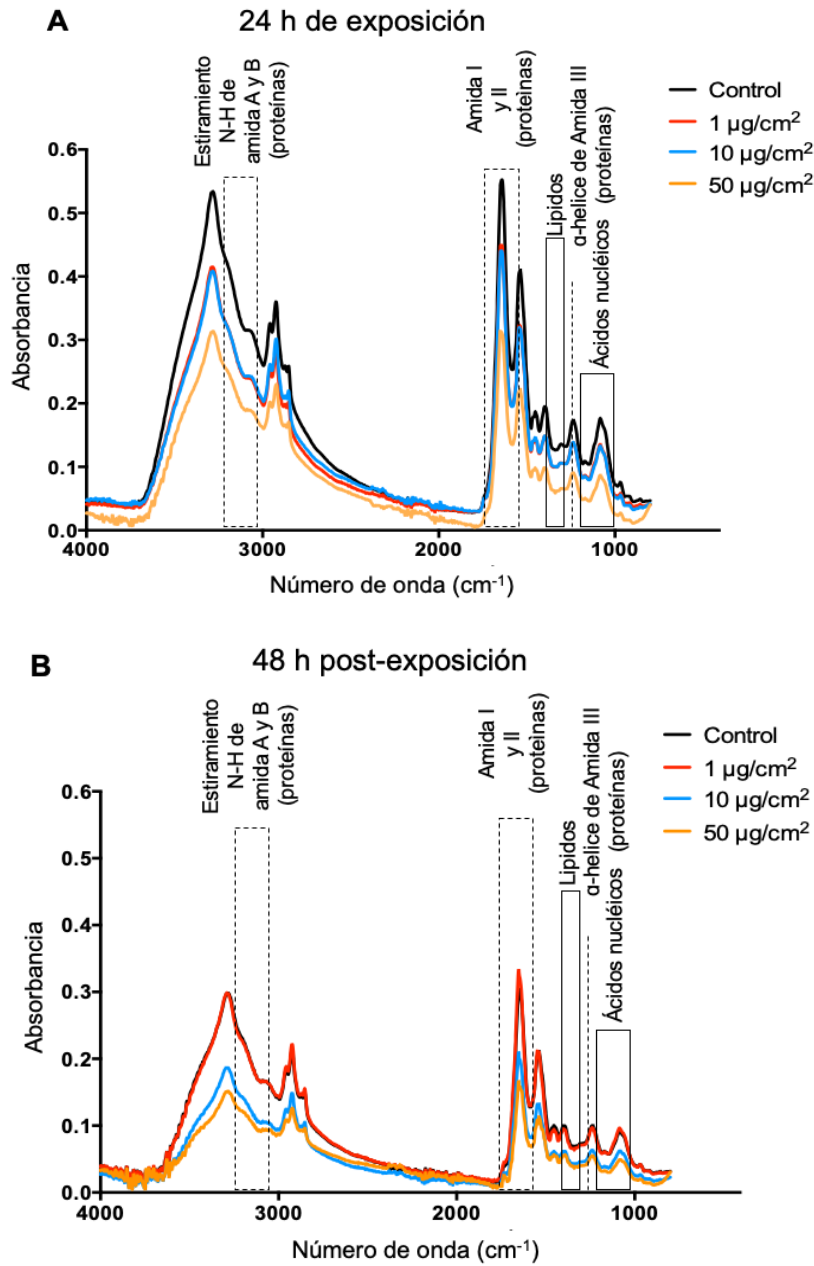


FIGURA 3.8. Espectros de infrarrojos de transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) en células expuestas a E171.

A. Espectros de las células después de 24 h de exposición a E171 (barras blancas).
 B. ya las 48 h post-exposición a E171 (barras grises).
 En ambos tratamientos, las células se expusieron a 1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Las diferentes regiones correspondientes a proteínas (1313 cm^{-1} , 1545 a 1652 cm^{-1} y 3067 a 3294 cm^{-1}) están marcadas con

LA ACUMULACIÓN DE DIÓXIDO DE TITANIO DE GRADO ALIMENTICIO PROVOCA ALTERACIONES CELULARES QUE PERSISTEN AÚN REMOVIENDO LA EXPOSICIÓN

cuadrados punteados. Las regiones correspondientes a lípidos (1399 cm^{-1} a 1451 cm^{-1}) y ADN (1084 cm^{-1} a 1243 cm^{-1}) están marcadas en cuadrados negros. Los datos muestran la media de tres experimentos independientes.

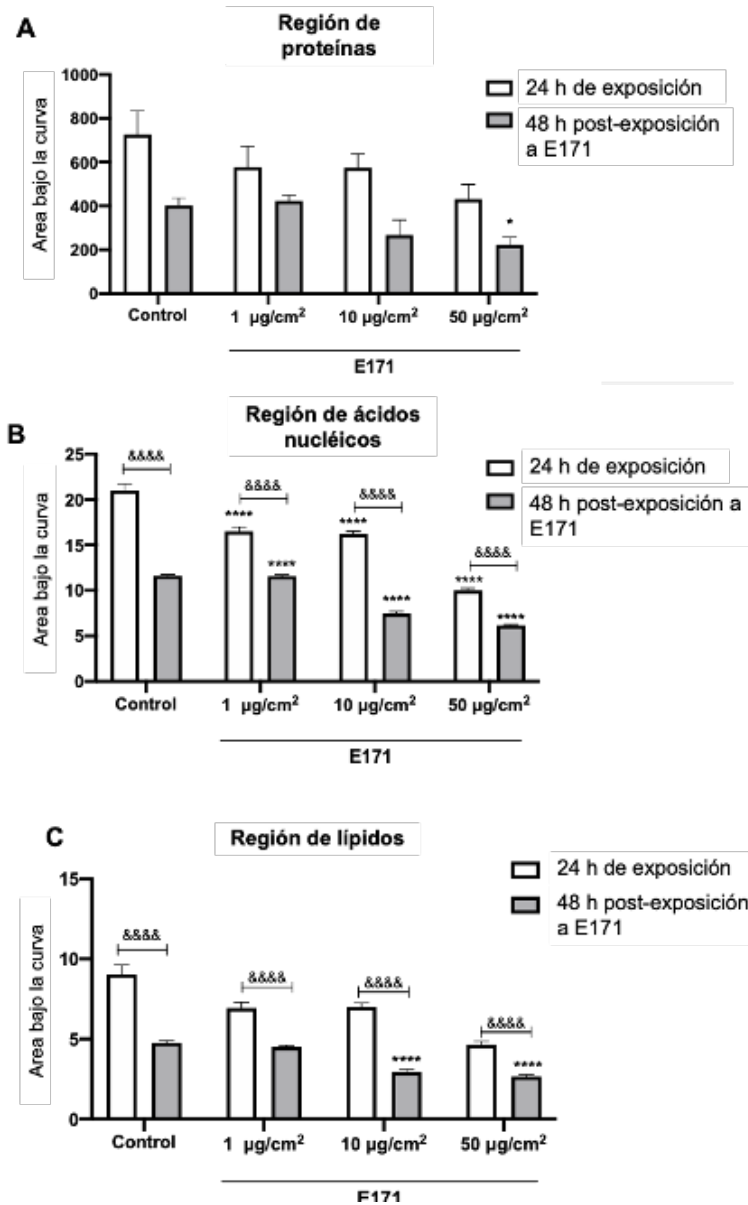


FIGURA 3.10. Área bajo la curva de los espectros de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) de células expuestas a E171. Se calculó el área bajo la curva de los espectros ATR-FTIR de A. proteínas, B. ácidos nucleicos y C. lípidos de las células después de 24 h de exposición a E171 (barras blancas) y 48 h post-exposición a E171 (barras grises). Los resultados se muestran como área bajo la curva de absorbancia/longitud de onda. En ambos tratamientos, las células se expusieron a 1, 10 y 50 µg/cm². Los datos muestran la

media \pm error estándar de tres experimentos independientes. **** $p \leq 0.0001$ vs control, *** $p \leq 0.001$ vs control, * $p \leq 0.05$ vs control y $p \leq 0.0001$ entre tiempos.

3.4.8 Localización de las partículas de E171

Para investigar la interacción entre E171 y el ADN en el núcleo celular, se analizó la localización de las partículas de E171 dentro de las células por medio de microscopia confocal y fluorescencia. En las células tratadas durante 24 h de exposición y en las células recuperadas 48 h después de la eliminación de E171, las partículas se localizaron alrededor del núcleo celular (**figuras 3.9A y 3.9B**). En la pila Z de imágenes confocales, se analizó cada núcleo para ver si se internalizaron partículas. Todas las partículas se encontraron en las proximidades del núcleo, pero no en el interior (**figura 3.9A**). Después de 24 h de exposición, el área del núcleo de las células expuestas a 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aumentó 2.32 ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.001$) y 2.24 ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.001$) veces (**figura 3.9C**). Sin embargo, no mostró diferencias significativas frente al control en células expuestas durante 24 h a 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($\alpha=0.05$, $p=0.1046$). En las células recuperadas 48 h después de la eliminación de E171, el área del núcleo de las células expuestas a 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aumentó 1,44 ($\alpha=0.05$, $p=0.009$) y 1,53 ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.0007$) veces. En las células expuestas a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171 y recuperadas 48 h después de retirar la exposición a E171 no se encontraron diferencias frente al control.

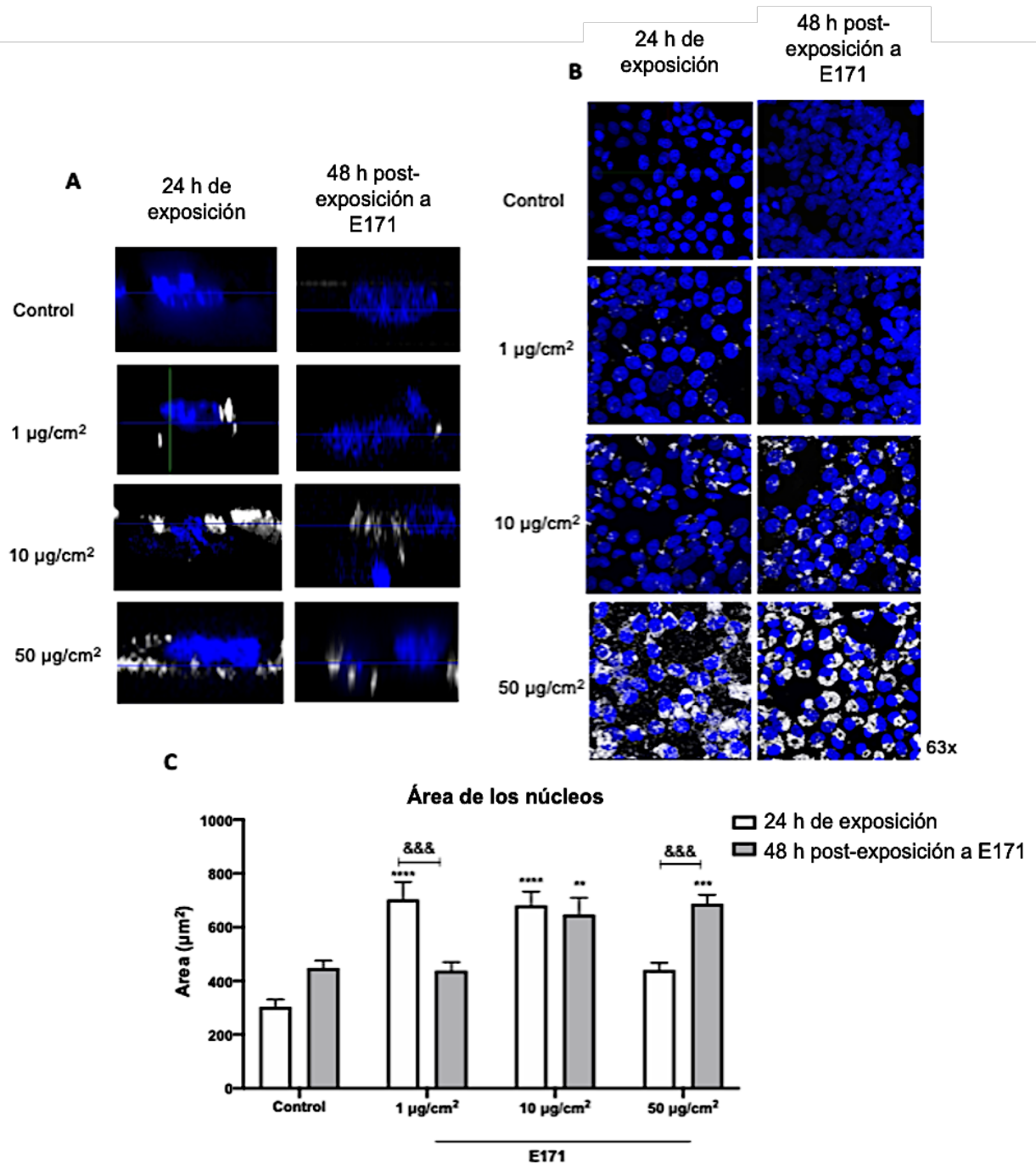


FIGURA 3.10. Localización perinuclear de partículas de E171 y área de núcleos.

Las imágenes de las células expuestas a 24 h de E171 (barras blancas) ya las 48 h después de la eliminación de E171 (barras grises) se tomaron mediante microscopía confocal. En ambos tratamientos, las células se expusieron a 1, 10 y 50 µg/cm². A) En cada imagen se ve un núcleo

representativo (azul), que muestra partículas E171 (blanco) alrededor del núcleo celular. B) Se muestran imágenes con un aumento de 63x de células después de 24 h de exposición a E171 y después de 48 h después de la exposición. C) La cuantificación de las áreas de los núcleos se realizaron en el software ImageJ. **** $p \leq 0.0001$ vs control, ** $p \leq 0.01$ vs control, &&& $p \leq 0.001$ entre tiempos. Se muestra la media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

3.4.9 Señalización de a DNA tras retirar exposición a E171

Para evaluar si el daño en el ADN inducido por la exposición a E171, es decir, las rupturas de doble cadena persistieron en las células después de eliminar la exposición, cuantificamos el nivel de γ H2AX en la fracción nuclear de las células. La cuantificación de γ H2AX en la fracción nuclear de las células mostró un aumento de 0,37 veces solo cuando se expuso a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($\alpha=0.05$, $P \leq 0.0017$) durante 24 h, mientras que 48 h después de la eliminación de E171, las células expuestas a $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.0250$) mostró un incremento de 0.26 veces en los niveles de γ H2AX. Como control positivo, las células se expusieron durante 24 h a $200 \mu\text{M}$ de H_2O_2 y los niveles de γ H2AX mostraron un aumento de 0.78 veces ($\alpha=0.05$, $p \leq 0.0001$) en comparación con las células de control (*figura 3.10*).

LA ACUMULACIÓN DE DIÓXIDO DE TITANIO DE GRADO ALIMENTICIO PROVOCA ALTERACIONES CELULARES QUE PERSISTEN AÚN REMOVIENDO LA EXPOSICIÓN

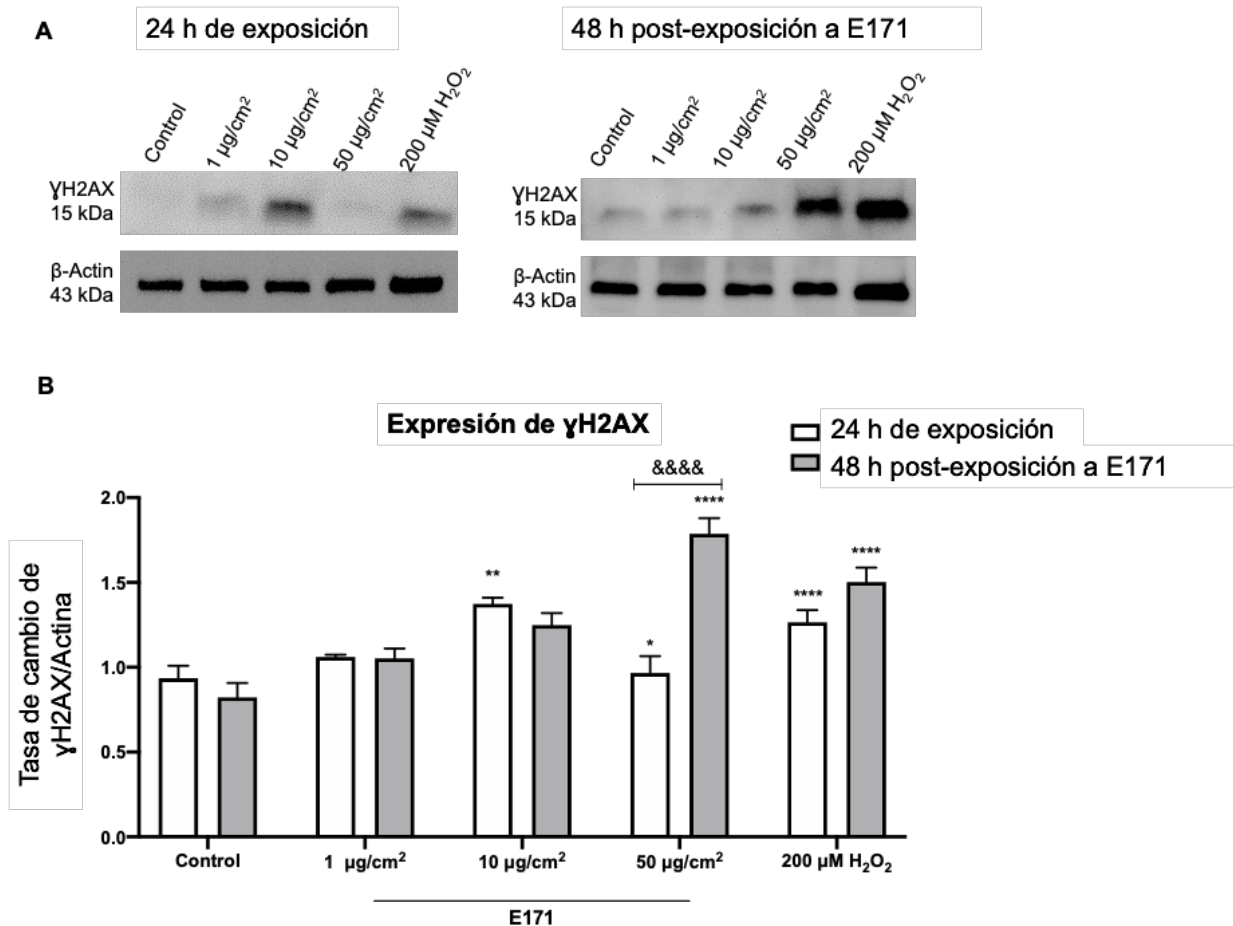


FIGURA 3.10. Niveles de proteína de γ H2AX en células expuestas a E171.

A. Imagen representativa de 10 μ g de proteína analizada por western blotting usando β -actina como control de carga en todos los tratamientos. B. Los análisis de densitometría de las células expuestas a 24 h de E171 (barras blancas) y 48 h post-exposición a E171 (barras grises) se realizaron y normalizaron como cambio de pliegue frente al control. Como control positivo, las células se expusieron durante 24 h a 200 μ M de H₂O₂. Los datos se presentan como media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes. ****p \leq 0.01 vs control, **p \leq 0.01, vs control, &&&p \leq 0.0001 entre tiempos.

3.4.10 Interrupción de la polimerización de tubulina después de la mitosis

Para analizar la influencia de las partículas E171 en el citoesqueleto de tubulina durante la mitosis, se detuvieron cultivos celulares en mitosis con citocalasina B, que es un compuesto que inhibe la polimerización de actina, pero no interactúa con la tubulina. Las células se expusieron al E171 y la interacción entre la tubulina alfa/beta (verde) y las partículas de E171 (blanco) se analizó mediante microscopía confocal. Las partículas de E171 no tenían interacción directa con la tubulina (**figuras 3.11A y 3.11B**). Se realizó la cuantificación de la fluorescencia de la tubulina, aumentando un 25% ($\alpha=0.05$, $P\leq 0.002$) en las células tras 24 h de exposición a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171. La tubulina disminuyó 53% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$) y 42% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0001$) en células después de 24 h de exposición a 10 y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171, mientras que 48 h post-exposición a E171, la fluorescencia de tubulina se restauró en las células expuestas a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171, disminuyendo un 22% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0036$) en comparación con las células de control. Sin embargo, después de 48 h post-exposición, la tubulina aumentó un 17% ($\alpha=0.05$, $p\leq 0.0304$) en células expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en comparación con el control, pero disminuyó un 36% ($\alpha=0.05$, $P\leq 0.0001$) en células expuestas a $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en comparación con el control (**figura 3.11C**). En general, encontramos que E171 no tuvo efectos sobre la polimerización de tubulina en la concentración más baja, mientras que la fluorescencia se recupera en la concentración intermedia. La fluorescencia de tubulina en células expuestas durante 24 h a E171 a la concentración más alta disminuyó y no se puede recuperar 48 h post-exposición a E171.

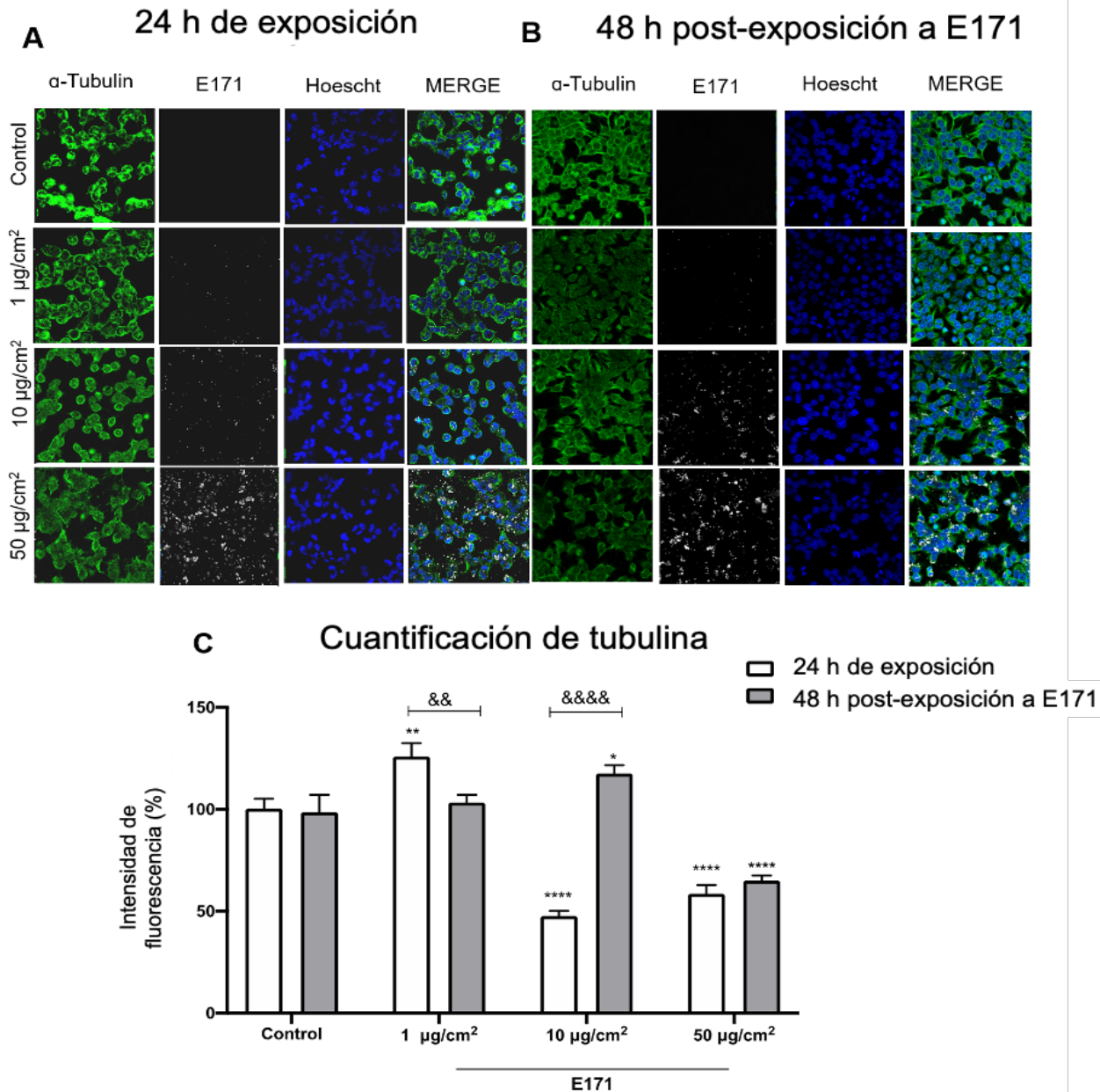


FIGURA 3.11. Análisis de polimerización de tubulina en células expuestas a E171.

Los núcleos se muestran en azul, la α -tubulina en verde y las partículas E171 en blanco. Las células se expusieron a A. 24 h de exposición a E171 y B. 48 h post-exposición a E171. En ambos tratamientos, las células se expusieron a 1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. C. La fluorescencia de la tubulina se cuantificó después de 24 h de exposición (barras blancas) y 48 h post-exposición a E171 (barras grises). Los datos muestran la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. **** $p \leq 0.0001$ vs control, &&&& $p \leq 0.0001$ entre tiempos y && $p \leq 0.001$ entre tiempos.

3.5 DISCUSIÓN

La toxicología de los aditivos alimenticios se ha enfrentado previamente a muchos desafíos cuando se desarrollan nuevas tecnologías a medida que los consumidores exigen nuevos productos asequibles y atractivos sin investigar completamente la toxicidad. En este sentido, los productos químicos como el bisfenol A, que alguna vez se consideraron seguros, ahora son ampliamente conocidos por ser tóxicos e incluso si se reduce el consumo, podría haber bioacumulación y efectos persistentes en los organismos vivos. Se ha detectado titanio en el bazo y el hígado de cadáveres humanos probablemente derivados del consumo oral de E171 (Heringa et al., 2018), y se ha encontrado en el meconio de los recién nacidos y en la placenta humana, lo que significa que se produce la transferencia materno-fetal (Guillard et al., 2020). Esto destaca la acumulación constante de E171 en varios órganos. La acumulación de E171 podría provocar alteraciones celulares que son persistentes incluso si se elimina la exposición, pero solo cuando las células continúan dividiéndose. Por lo tanto, en este estudio, demostramos primero que E171 se internalizó en las células del colon y no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular en las concentraciones probadas y dado que E171 puede ser internalizado por las células sin citotoxicidad (Proquin et al., 2017), las células pueden transmitir E171 partículas con cada división celular. La caracterización de partículas mostró que E171 está compuesto de partículas amorfas de alrededor de 100 nm de tamaño, lo que concuerda con informes anteriores sobre el tamaño y la forma de E171 (EFSA, 2021). Sin embargo, el análisis SEM mostró algunas partículas por debajo de 100 nm, lo que destaca los posibles efectos adversos asociados con las partículas E171 a nanoescala. Además, demostramos que el E171 utilizado en este estudio presenta una fase cristalina correspondiente a anatasa como lo indica la espectroscopia Raman. La anatasa es la fase más fotocatalítica del TiO_2 (Zhang et al., 2014) lo que concuerda con la actividad fotocatalítica mostrada por E171 en el ensayo de azul de metileno. Luego, usamos 3 concentraciones diferentes de exposición en nuestros experimentos. Las células expuestas a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ tuvieron aglomerados de 70 nm mientras que las células expuestas a 10 y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ estuvieron expuestas a aglomerados de 874 nm. Hipotetizamos que el tamaño de los aglomerados podría influir en la captación de E171 y que los aglomerados más pequeños podrían internalizarse a

LA ACUMULACIÓN DE DIÓXIDO DE TITANIO DE GRADO ALIMENTICIO PROVOCA ALTERACIONES CELULARES QUE PERSISTEN AÚN REMOVIENDO LA EXPOSICIÓN

una tasa más alta; sin embargo, concluimos que el tamaño de los aglomerados no influyó en los efectos celulares analizados en este estudio. De hecho, la cuantificación de titanio en las células expuestas a los aglomerados más pequeños mostró una menor cantidad de titanio, mientras que las células expuestas a $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ mostraron la mayor concentración de titanio. El contenido de titanio en las células expuestas a $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a las 24 h de exposición mostró un aumento de 21 veces frente a las células de control mientras que 48 h post-exposición a E171, el contenido de titanio fue 69 veces mayor, esto podría deberse a que podría haber partículas en la superficie celular que se internalizaron incluso después de la eliminación de la exposición E171 (Wang et al., 2015). Además, la granularidad celular, que está influenciada por la internalización de E171, fue menor en las células expuestas a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ con aglomerados de tamaño más pequeño que la granularidad de las células expuestas a la concentración más alta de E171 y aglomerados de mayor tamaño. Esto indica que, incluso cuando las células se expusieron a aglomerados de menor tamaño, estos no tuvieron una mayor tasa de captación de E171, al menos en cultivos de células HCT116. El objetivo principal de este estudio fue la comparación entre los efectos en células expuestas durante 24 h a E171 y aquellos cultivos celulares después de 48 h post-exposición a E171. Hipotetizamos que las alteraciones celulares debidas a la exposición al E171 podrían durar después de eliminar el E171, ya que este aditivo alimentario se acumula y un estudio anterior demostró que la tasa de liberación de TiO_2 en un cultivo de células neuronales es baja, el porcentaje de liberación fue de alrededor del 35% después 24 h después de eliminar TiO_2 del medio de cultivo celular (Wang et al., 2013), lo que sugiere que E171 podría mostrar una tasa de liberación similar. Además, otro estudio demostró que a una alta concentración de TiO_2 , el proceso de exocitosis se vio interrumpido por el exceso de partículas en la superficie celular (Wang et al., 2015). Esto concuerda con lo que hemos detectado en nuestro estudio, en el que a la concentración más alta de E171, hay menos liberación de E171. Además, demostramos que E171 no indujo la producción intrínseca de ROS a través de la técnica de DCFH-DA en ausencia de luz; sin embargo, el ensayo de azul de metileno mostró que, en presencia de luz ultravioleta, E171 es fotocatalítico y en las células, E171 produce un aumento sostenido de ROS. De hecho, este resultado concuerda con la literatura previa en la que dos muestras de E171 inducen la

producción de ROS en otra línea celular de colon como Caco-2 (Hwang et al., 2019). Las ROS sostenidas inducidas por E171 podrían provocar daños en el ADN (Srinivas et al., 2019) y/o cambios en la microbiota del colon que se ha demostrado que participan en la carcinogénesis del colon (Barreau et al., 2021). Además, la producción sostenida de ROS podría deberse a la adsorción de proteínas alrededor de las partículas que reducen su potencial oxidativo (Snez hkina et al., 2019). Dado que la producción de ROS aumentó después de 24 h de exposición a E171 y se mantuvo 48 h post-exposición a E171, sospechamos algunas alteraciones en la defensa enzimática antioxidante (Hadwan, 2018). La actividad de GR aumentó después de 24 h de exposición a E171, probablemente como un indicador de estrés oxidativo; sin embargo, la actividad de esta enzima disminuyó después de 48 h post-exposición a E171. Esto podría explicarse por una disminución en la disponibilidad de glutatión oxidado, que es su sustrato. La actividad de GPx disminuyó solo después de 24 h de exposición a E171 y, aparentemente, la actividad se restablece después de 48 h post-exposición a E171, lo que sugiere una respuesta adaptativa contra la producción de ROS, ya que se mantuvo después de la eliminación de E171. La actividad de catalasa permaneció sin cambios, lo cual es coherente con la literatura, en la que se afirma que esta enzima y su ARNm son altamente resistentes al H₂O₂ (Akman et al., 1989). En general, E171 no puede inducir un desequilibrio significativo en el sistema enzimático antioxidante analizado en este estudio. Sin embargo, la persistencia de ROS podría conducir a una inestabilidad genómica asociada a procesos cancerígenos (Limoli et al., 2013). Como sospechábamos, nuestros resultados mostraron que E171 causó algunas alteraciones después de 24 h de exposición y esas alteraciones permanecieron al menos durante 48 h, incluso si E171 se eliminó de los cultivos celulares. Estos resultados se obtuvieron en condiciones no citotóxicas de cultivos celulares (0, 1, 10 y 50 µg/cm²) para evitar la interferencia de la muerte celular en la interpretación de los resultados y para imitar la exposición real, en la que el consumo de E171 no provoca citotoxicidad. Los efectos informados en nuestro estudio están relacionados con la captación de células E171, que fue evidente por el aumento de la granularidad celular y por la cuantificación de titanio dentro de las células. Sin embargo, el aumento de la granularidad celular también podría atribuirse a otros cambios inducidos por la acumulación de E171. Por ejemplo, el aumento de la

granularidad intracelular se asocia con importantes puntos finales celulares relacionados con el cáncer y la respuesta a la terapia contra el cáncer, como la senescencia, la apoptosis y la detención del crecimiento (Haynes et al., 2009). Una de las hipótesis que teníamos fue que acumulación de E171 y la producción sostenida de ROS podrían inducir daños en el ADN incluso si se eliminaba la exposición a E171. La fosforilación de H2AX (γ H2AX), un indicador de rupturas doble cadena en el DNA (Collins et al., 2020) no se encontró en las células expuestas a la concentración más baja y solo aumentó ligeramente después de 24 h de exposición a E171. Sin embargo, el hallazgo más interesante fue la acumulación de ADN dañado en la concentración más alta de E171 después de 48 de eliminación de E171, que también fue mayor en comparación con los niveles de γ H2AX en células expuestas a H₂O₂. También destacamos que E171 indujo el daño del ADN en el núcleo indirectamente, ya que no se ubicaron partículas de E171 en los núcleos. Debido a que E171 mejora la tumorigénesis en el colon (Urrutia-Ortega et al., 2016), también especulamos que, en este estudio, E171 podría aumentar el tamaño nucleolar y, como consecuencia, el área del núcleo. De hecho, la desregulación de la expresión de la proteína 545 con dedos de zinc induce un aumento en el tamaño nucleolar, que se asocia con una regulación positiva en la biogénesis de los ribosomas durante la tumorigénesis colorrectal (Wang et al., 2021). Además, el aumento del área nuclear que es característico de las células cancerosas a veces es causado por un aumento en la ploidía y un aumento en los focos γ H2AX a medida que las células se vuelven tetraploides (Gemble et al., 2022). De hecho, esperábamos que un mayor tamaño de los núcleos pudiera estar asociado con un aumento de γ H2AX, sin embargo, encontramos que la exposición a E171 durante 24 h indujo un rápido aumento en el área de los núcleos, que no se observó en la concentración más alta, y, por el contrario, después de la eliminación de E171, el área de los núcleos aumentó en la concentración más alta. Si bien no están claras las implicaciones de las alteraciones en el tamaño nuclear, las células pueden regular el tamaño y la morfología del núcleo a través de la dinámica del citoesqueleto, lo que podría cambiar la concentración de proteína nuclear, la regulación génica y la transcripción (Kim et al., 2015; Tocco et al., 2018). Además, la presencia de γ H2AX es una fuerte evidencia de rupturas de doble cadena en el

ADN, lo que está en línea con la evidencia previa del potencial genotóxico de E171 en células de colon (Proquin et al., 2017).

También analizamos patrones moleculares de alteración en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos; encontramos que la estructura de las proteínas no se alteró, mientras que los lípidos y los ácidos nucleicos mostraron modificaciones. En particular, existe preocupación por las alteraciones en los ácidos nucleicos debido al impacto en la estructura del ADN. Esta alteración ocurre, como explicamos anteriormente, indirectamente ya que no se detectaron partículas de E171 en los núcleos. Los cambios en los espectros de los lípidos podrían explicarse por las interacciones físicas entre las partículas de E171 y los lípidos de la membrana celular, pero también con los orgánulos encerrados en la membrana, como los lisosomas, el aparato de Golgi y las mitocondrias. Anteriormente informamos que las NP de TiO₂ pueden interactuar con los orgánulos de la membrana, como las mitocondrias, lo que lleva a un deterioro de la función mitocondrial (Freyre-Fonseca et al., 2011), sugerimos que E171 también podría interactuar directamente con los lípidos de las mitocondrias y otros orgánulos membranosos que explican la alteración en los espectros de lípidos analizados por ATR-FTIR.

La internalización de E171 podría conducir a la acumulación de vesículas en el citoplasma, y esperábamos alteraciones estructurales en la red del citoesqueleto. La tubulina, el principal componente de la red del citoesqueleto, disminuyó probablemente debido a la despolimerización de la tubulina en las células expuestas a 10 µg/cm²; sin embargo, esta disminución se revirtió 48 h post-exposición a E171. Las células expuestas a la concentración más alta no mostraron recuperación en la despolimerización de tubulina. La despolimerización podría tener un impacto no solo en la estructura, sino también, durante la mitosis, en la polimerización de los microtúbulos, lo que podría conducir a una incorrecta segregación cromosómica o podría afectar el movimiento de los orgánulos intracelulares (Sept, 2007). De hecho, sospechamos que la formación de micronúcleos detectada previamente en células de cáncer de colon expuestas a E171 (Proquin et al., 2017) podría estar relacionada con el deterioro en la polimerización de α-tubulina (Ter Har et al., 1996). La despolimerización de tubulina ha sido reportada en tubulina aislada de tejido cerebral, en la cual la exposición a NPs de TiO₂ indujo la despolimerización por interacción directa entre proteína y NPs (Gheshlaghi

et al., 2008). Además, no hubo colocalización entre partículas y tubulina, lo que significa que no hubo interacción directa de partículas E171 con microtúbulos. Por lo tanto, algunas otras posibilidades implican la adición de TiO_2 a los heterodímeros de los túbulos en el citoplasma, lo que impide la polimerización de los microtúbulos (Mao et al., 2015). En general, sugerimos que E171 se retiene en las células y puede causar alteraciones celulares después de la eliminación, ya que estas partículas no se liberan ni se metabolizan/degradan. Según la literatura, el consumo de E171 se inicia a edades tempranas y en niños es mayor (1-10 mg/Kg_{bw}) que, en adultos, y estas partículas de E171 permanecerían por un tiempo desconocido en algunos tejidos como colon, hígado, y bazo (Weir et al., 2012; Heringa et al., 2016). Más allá de los efectos del E171 en la salud humana después de la exposición oral, nos gustaría advertir que incluso si la estimación de la eliminación del E171 en humanos es superior al 90 % a través de las heces, la cantidad eliminada de E171 podría acumularse en el medio ambiente, incluidos el suelo y el océano, lo que provocaría a la bioacumulación en la red alimentaria. En este sentido, se detectaron NP de TiO_2 en muestras de surimi de mercados de España (Taboada-López et al., 2018). Otros estudios han demostrado que los mariscos procesados, como la almeja y otros peces pelágicos, también contienen TiO_2 NP (Grasso et al., 2020). La contribución más importante de este estudio es la evidencia de las alteraciones sostenidas antes mencionadas 48 h post-exposición a E171 en células de colon. Además, demostramos que la exposición al E171 muestra efectos aleatorios en las células, lo que significa que en este punto no hay resultados predecibles de la exposición al E171, lo que lo hace más riesgoso ya que no se pueden tomar medidas de protección específicas. Además, esa genotoxicidad no se debe a una interacción directa de E171 con el ADN. Además, los efectos de la exposición al E171 no dependen de la concentración, lo que significa que, en un rango de concentraciones, el E171 podría ejercer diferentes mecanismos de toxicidad probablemente relacionados con el tamaño del aglomerado. Nuestro estudio advierte de alteraciones sostenidas tras la exposición a E171 incluso si se interrumpe el consumo, posiblemente asociadas a la baja liberación de E171 de las células y la producción leve pero sostenida de ROS.

3.6 CONCLUSIONES

Después de 24 h de exposición, el E171 se ubica perinuclearmente en las células del colon, pero no es internalizado en los núcleos. Además, los depósitos de E171 en el citoplasma se mantuvieron al menos durante 48 h post-exposición a E171, lo que sugiere una baja tasa de exocitosis. El área del núcleo aumentó en las células después de 24 h de exposición y se mantuvo después de la eliminación de E171.

La exposición a E171 induce rupturas de doble cadena en el ADN medidas como expresión de γ H2AX en células expuestas durante 24 h a una concentración intermedia y 48 h post-exposición a E171 en la concentración más alta. Por otro lado, demostramos que el daño al ADN y las alteraciones en el tamaño de los núcleos no se deben a una interacción directa de las partículas con el ADN.

La exposición a E171 durante 24 h indujo alteraciones en las huellas dactilares moleculares de ácidos nucleicos y lípidos, aumento en la producción de ROS, aumento de la actividad de GR y disminución de la actividad de GPx. Además, de alteraciones en la tubulina.

El E171 permaneció acumulado en las células de manera perinuclear además de que las alteraciones en los patrones moleculares de los ácidos nucleicos, lípidos, tubulina y la producción de ROS también se mantuvieron 48 h post-exposición a E171.

Los resultados de este estudio advierten de alteraciones sostenidas después de la exposición a E171 incluso si se interrumpe el consumo, posiblemente asociadas con la baja liberación de E171 de las células y la producción sostenida de ROS.

3.7 RESUMEN GRÁFICO

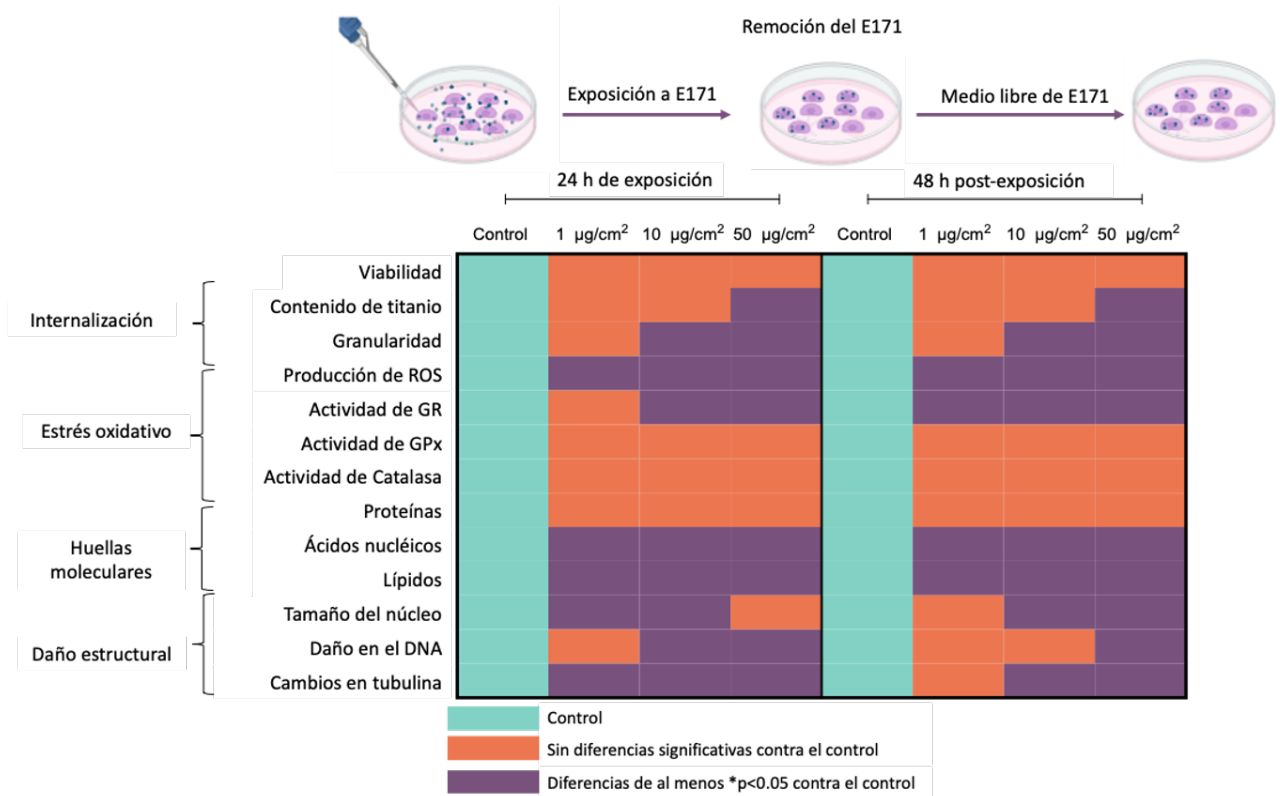


FIGURA 3.12. Resultados de la internalización del E171, estrés oxidativo, biomoléculas y daño estructural. Se observan los patrones de cambios a 24 h de exposición y que en su mayoría se mantienen a las 48 h después de retirar la exposición.

3.7 REFERENCIAS

1. Aebi, H.E., (1982). Catalase, in *Methods of Enzymatic Analysis* (vol III), 3 ed., Weinheim, Verlag Chemie, 1982, 273-286. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3>
2. Akman, S. A., Forrest, G., Chu, F. F., & Doroshov, J. H. (1989). Resistance to hydrogen peroxide associated with altered catalase mRNA stability in MCF7 breast cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1009(1), 70-74. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(89\)90080-8](https://doi.org/10.1016/0167-4781(89)90080-8)
3. Barreau, F., Tisseyre, C., Ménard, S., Ferrand, A., & Carriere, M. (2021). Titanium dioxide particles from the diet: involvement in the genesis of inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *Particle and Fibre Toxicology*, 18(1). doi:10.1186/s12989-021-00421-2
4. Bettini, S., Boutet-Robinet, E., Cartier, C., Coméra, C., Gaultier, E., Dupuy, J., Naud, N., Taché, S., Grysan, P., Reguer, S., Thieriet, N., Réfrégiers, M., Thiaudière, D., Cravedi, J. P., Carrière, M., Audinot, J. N., Pierre, F. H., Guzylack-Piriou, L., & Houdeau, E. (2017). Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Scientific reports*, 7, 40373. <https://doi.org/10.1038/srep40373>
5. Blaznik, U., Krušič, S., Hribar, M., Kušar, A., Žmitek, K., & Pravst, I. (2021). Use of Food Additive Titanium Dioxide (E171) before the Introduction of Regulatory Restrictions Due to Concern for Genotoxicity. *Foods* (Basel, Switzerland), 10(8), 1910. <https://doi.org/10.3390/foods10081910>
6. Blough, E., Dineen, B., & Esser, K. (1999). Extraction of nuclear proteins from striated muscle tissue. *BioTechniques*, 26(2), 202-206. <https://doi.org/10.2144/99262bm05>
7. Brun, E., Barreau, F., Veronesi, G., Fayard, B., Sorieul, S., Chanéac, C., Carapito, C., Rabilloud, T., Mabondzo, A., Herlin-Boime, N., & Carrière, M. (2014). Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Particle and fibre toxicology*, 11, 13. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-13>
8. Carlberg, I., Mannervik, B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem*;250(14):5475-80.

9. Collins, P. L., Purman, C., Porter, S. I., Nganga, V., Saini, A., Hayer, K. E., Gurewitz, G. L., Sleckman, B. P., Bednarski, J. J., Bassing, C. H., & Oltz, E. M. (2020). DNA double-strand breaks induce H2Ax phosphorylation domains in a contact-dependent manner. *Nature communications*, 11(1), 3158. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16926-x>
10. European Food Safety Authority. (2021). Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive. *EFSA J* 2021;19(5):6585 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6585>
11. Freyre-Fonseca, V., Delgado-Buenrostro, N. L., Gutiérrez-Cirlos, E. B., Calderón-Torres, C. M., Cabellos-Avelar, T., Sánchez-Pérez, Y., Pinzón, E., Torres, I., Molina-Jijón, E., Zazueta, C., Pedraza-Chaverri, J., García-Cuéllar, C. M., & Chirino, Y. I. (2011). Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. *Toxicology letters*, 202(2), 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.01.025>
12. Geiss, O., Ponti, J., Senaldi, C., Bianchi, I., Mehn, D., Barrero, J., Gilliland, D., Matissek, R., & Anklam, E. (2020). Characterisation of food grade titania with respect to nanoparticle content in pristine additives and in their related food products. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 37(2), 239-253. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1695067>
13. Gemble, S., Wardenaar, R., Keuper, K., Srivastava, N., Nano, M., Macé, A. S., Tijhuis, A. E., Bernhard, S. V., Spierings, D., Simon, A., Goundiam, O., Hochegger, H., Piel, M., Foijer, F., Storchová, Z., & Basto, R. (2022). Genetic instability from a single S phase after whole-genome duplication. *Nature*, 604(7904), 146-151. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04578-4>
14. Gheshlaghi, Z. N., Riazi, G. H., Ahmadian, S., Ghafari, M., & Mahinpour, R. (2008). Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 40(9), 777-782. PMID: 18776989. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00458.x>
15. Grasso, A., Ferrante, M., Zuccarello, P., Filippini, T., Arena, G., Fiore, M., Cristaldi, A., Conti, G. O., & Copat, C. (2020). Chemical Characterization and Quantification of Titanium Dioxide Nanoparticles (TiO₂-NPs) in Seafood by Single-Particle ICP-MS: Assessment of

Dietary Exposure. *International journal of environmental research and public health*, 17(24), 9547. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249547>

16. Guillard, A., Gaultier, E., Cartier, C., Devoille, L., Noireaux, J., Chevalier, L., Morin, M., Grandin, F., Lacroix, M. Z., Coméra, C., Cazanave, A., de Place, A., Gayraud, V., Bach, V., Chardon, K., Bekhti, N., Adel-Patient, K., Vayssière, C., Fisticaro, P., Feltin, N., Houdeau, E. (2020). Basal Ti level in the human placenta and meconium and evidence of a materno-foetal transfer of food-grade TiO₂ nanoparticles in an ex vivo placental perfusion model. *Particle and fibre toxicology*, 17(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00381-z>

17. Hadwan, M., H. (2018). Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. *BMC biochemistry*, 19(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12858-018-0097-5>

18. Hayashi, T., & Faustman, D. (2000). Essential role of human leukocyte antigen-encoded proteasome subunits in NF-kappaB activation and prevention of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 275(7), 5238-5247. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.5238>

19. Haynes, M. K., Strouse, J. J., Waller, A., Leitao, A., Curpan, R. F., Bologna, C., Oprea, T. I., Prossnitz, E. R., Edwards, B. S., Sklar, L. A., & Thompson, T. A. (2009). Detection of intracellular granularity induction in prostate cancer cell lines by small molecules using the HyperCyt high-throughput flow cytometry system. *Journal of biomolecular screening*, 14(6), 596-609. <https://doi.org/10.1177/1087057109335671>

20. Heringa, M. B., Geraets, L., van Eijkeren, J. C., Vandebriel, R. J., de Jong, W. H., & Oomen, A. G. (2016). Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure, including toxicokinetic considerations. *Nanotoxicology*, 10(10), 1515-1525. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1238113>

21. Heringa, M. B., Peters, R., Bleys, R., van der Lee, M. K., Tromp, P. C., van Kesteren, P., van Eijkeren, J., Undas, A. K., Oomen, A. G., & Bouwmeester, H. (2018). Detection of titanium particles in human liver and spleen and possible health implications. *Particle and fibre toxicology*, 15(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0251-7>

22. Hou, J., Wang, L., Wang, C., Zhang, S., Liu, H., Li, S., & Wang, X. (2019). Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *Journal of environmental sciences (China)*, 75, 40-53. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.06.010>
23. Huerta-García, E., Pérez-Arizti, J. A., Márquez-Ramírez, S. G., Delgado-Buenrostro, N. L., Chirino, Y. I., Iglesias, G. G., & López-Marure, R. (2014). Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells. *Free radical biology & medicine*, 73, 84-94. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.026>
24. Hwang, J. S., Yu, J., Kim, H. M., Oh, J. M., & Choi, S. J. (2019). Food Additive Titanium Dioxide and Its Fate in Commercial Foods. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 9(8), 1175. <https://doi.org/10.3390/nano9081175>
25. Kim, D. H., Li, B., Si, F., Phillip, J. M., Wirtz, D., & Sun, S. X. (2015). Volume regulation and shape bifurcation in the cell nucleus. *Journal of cell science*, 128(18), 3375-3385. <https://doi.org/10.1242/jcs.166330>
26. Lammel, T., Mackevica, A., Johansson, B. R., & Sturve, J. (2019). Endocytosis, intracellular fate, accumulation, and agglomeration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in the rainbow trout liver cell line RTL-W1. *Environmental science and pollution research international*, 26(15), 15354-15372. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04856-1>
27. Limoli, C. L., & Giedzinski, E. (2003). Induction of chromosomal instability by chronic oxidative stress. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 5(4), 339-346. [https://doi.org/10.1016/S1476-5586\(03\)80027-1](https://doi.org/10.1016/S1476-5586(03)80027-1)
28. Mao, Z., Xu, B., Ji, X., Zhou, K., Zhang, X., Chen, M., Han, X., Tang, Q., Wang, X., & Xia, Y. (2015). Titanium dioxide nanoparticles alter cellular morphology via disturbing the microtubule dynamics. *Nanoscale*, 7(18), 8466-8475. <https://doi.org/10.1039/c5nr01448d>
29. Natarajan, V., Wilson, C. L., Hayward, S. L., & Kidambi, S. (2015). Titanium Dioxide Nanoparticles Trigger Loss of Function and Perturbation of Mitochondrial Dynamics in Primary Hepatocytes. *PloS one*, 10(8), e0134541. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134541>
30. Pedata, P., Ricci, G., Malorni, L., Venezia, A., Cammarota, M., Volpe, M. G., Iannaccone, N., Guida, V., Schiraldi, C., Romano, M., & Iacomino, G. (2019). In vitro intestinal

epithelium responses to titanium dioxide nanoparticles. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 119, 634-642. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.041>

31. Peters, R. J., van Bommel, G., Herrera-Rivera, Z., Helsper, H. P., Marvin, H. J., Weigel, S., Tromp, P. C., Oomen, A. G., Rietveld, A. G., & Bouwmeester, H. (2014). Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(27), 6285-6293. <https://doi.org/10.1021/jf5011885>

32. Proquin, H., Rodríguez-Ibarra, C., Moonen, C. G., Urrutia-Ortega, I. M., Briedé, J. J., de Kok, T. M., van Loveren, H., & Chirino, Y. I. (2017). Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis*, 32(1), 139-149. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew051>

33. Ranstam, J. (2012). Repeated measurements, bilateral observations and pseudoreplicates, why does it matter? *Osteoarthritis and cartilage*;20(6), 473-475. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.02.011>

34. Rompelberg, C., Heringa, M. B., van Donkersgoed, G., Drijvers, J., Roos, A., Westenbrink, S., Peters, R., van Bommel, G., Brand, W., & Oomen, A. G. (2016). Oral intake of added titanium dioxide and its nanofraction from food products, food supplements and toothpaste by the Dutch population. *Nanotoxicology*, 10(10), 1404-1414. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1222457>

35. Sept, D. (2007). Microtubule polymerization: one step at a time. *Current biology: CB*, 17(17), R764-R766. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.002>

36. Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G. S., & Dmitriev, A. A. (2019). ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 6175804. <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>

37. Srinivas, U. S., Tan, B., Vellayappan, B. A., & Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox biology*, 25, 101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>

38. Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*, 111, A3.B.1-A3. B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
39. Taboada-López, M. V., Herbello-Hermelo, P., Domínguez-González, R., Bermejo-Barrera, P., & Moreda-Piñeiro, A. (2019). Enzymatic hydrolysis as a sample pre-treatment for titanium dioxide nanoparticles assessment in surimi (crab sticks) by single particle ICP-MS. *Talanta*, 195, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.023>
40. Talamini, L., Gimondi, S., Violatto, M. B., Fiordaliso, F., Pedica, F., Tran, N. L., Sitia, G., Aureli, F., Raggi, A., Nelissen, I., Cubadda, F., Bigini, P., & Diomedea, L. (2019). Repeated administration of the food additive E171 to mice results in accumulation in intestine and liver and promotes an inflammatory status. *Nanotoxicology*, 13(8), 1087-1101. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1640910>
41. Talari, A. C. S., Martinez, M. A. G., Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2016). Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 52(5), 456-506. <https://doi.org/10.1080/05704928.2016.1230863>
42. Ter Haar, E., Day, B. W., & Rosenkranz, H. S. (1996). Direct tubulin polymerization perturbation contributes significantly to the induction of micronuclei in vivo. *Mutation research*, 350(2), 331-337. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00175-1](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00175-1)
43. Tocco, V. J., Li, Y., Christopher, K. G., Matthews, J. H., Aggarwal, V., Paschall, L., Luesch, H., Licht, J. D., Dickinson, R. B., & Lele, T. P. (2018). The nucleus is irreversibly shaped by motion of cell boundaries in cancer and non-cancer cells. *Journal of cellular physiology*, 233(2), 1446-1454. <https://doi.org/10.1002/jcp.26031>
44. Urrutia-Ortega, I. M., Garduño-Balderas, L. G., Delgado-Buenrostro, N. L., Freyre-Fonseca, V., Flores-Flores, J. O., González-Robles, A., Pedraza-Chaverri, J., Hernández-Pando, R., Rodríguez-Sosa, M., León-Cabrera, S., Terrazas, L. I., van Loveren, H., & Chirino, Y. I. (2016). Food-grade titanium dioxide exposure exacerbates tumor formation in colitis associated cancer model. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 93, 20-31. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.014>

45. Vazquez-Zapien, G. J., Mata-Miranda, M. M., Sanchez-Monroy, V., Delgado-Macuil, R. J., Perez-Ishiwara, D. G., & Rojas-Lopez, M. (2016). FTIR Spectroscopic and Molecular Analysis during Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Pancreatic Cells. *Stem cells international*, 2016, 6709714. <https://doi.org/10.1155/2016/6709714>
46. Venkatachari, P., Hopke, P. K., Grover, B. D. and Eatough, D.J. (2005). Measurement of Particle-Bound Reactive Oxygen Species in Rubidoux Aerosols. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 50, 49-58. <https://doi.org/10.1007/s10874-005-1662-z>
47. Wang, S., Wong, C. C., Zhang, Y., Huang, J., Li, C., Zhai, J., Wang, G., Wei, H., Zhang, X., He, H. H., & Yu, J. (2021). ZNF545 loss promotes ribosome biogenesis and protein translation to initiate colorectal tumorigenesis in mice. *Oncogene*, 40(48), 6590-6600. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01938-8>
48. Wang, X., Wu, Q., Li, C., Zhou, Y., Xu, F., Zong, L., & Ge, S. (2020). A study of Parkinson's disease patients 'serum using FTIR spectroscopy. *Infrared Physics & Technology*, 103279. <https://doi:10.1016/j.infrared.2020.103279>
49. Wang, Y., Wu, Q., Sui, K., Chen, X. X., Fang, J., Hu, X., Wu, M., & Liu, Y. (2013). A quantitative study of exocytosis of titanium dioxide nanoparticles from neural stem cells. *Nanoscale*, 5(11), 4737-4743. <https://doi.org/10.1039/c3nr00796k>
50. Wang, Y., Yao, C., Li, C., Ding, L., Liu, J., Dong, P., Fang, H., Lei, Z., Shi, G., & Wu, M. (2015). Excess titanium dioxide nanoparticles on the cell surface induce cytotoxicity by hindering ion exchange and disrupting exocytosis processes. *Nanoscale*, 7(30), 13105-13115. <https://doi.org/10.1039/c5nr03269e>
51. Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., & von Goetz, N. (2012). Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental science & technology*, 46(4), 2242-2250. <https://doi.org/10.1021/es204168d>
52. Xu, C., Rangaiah, G. P., & Zhao, X. S. (2014). Photocatalytic Degradation of Methylene Blue by Titanium Dioxide: Experimental and Modeling Study. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(38), 14641-14649. <https://doi:10.1021/ie502367x>

53. Yang, Y., Doudrick, K., Bi, X., Hristovski, K., Herckes, P., Westerhoff, P., & Kaegi, R. (2014). Characterization of food-grade titanium dioxide: the presence of nanosized particles. *Environmental science & technology*, 48(11), 6391-6400. <https://doi.org/10.1021/es500436x>
54. Yin, C., Zhao, W., Liu, R., Liu, R., Wang, Z., Zhu, L., Liu, S. (2017). TiO₂ particles in seafood and surimi products: Attention should be paid to their exposure and uptake through foods. *Chemosphere*, 188, 541-547. <https://doi:10.1016/j.chemosphere.2017.08.168>
55. Zhang, J., Zhou, P., Liu, J., & Yu, J. (2014). New understanding of the difference of photocatalytic activity among anatase, rutile and brookite TiO₂. *Physical chemistry chemical physics*: PCCP, 16(38), 20382-20386. <https://doi.org/10.1039/c4cp02201>

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

4.1 DISCUSIÓN

Esta tesis pretende añadir evidencias para una mejor toma de decisiones en cuanto a la consideración del riesgo del uso del E171 como aditivo en alimentos. Aunado a esto, se abordan temas que no se han investigado en cuanto al consumo de E171 como lo es la susceptibilidad con respecto a dos grupos de edad que son jóvenes y adultos y al sexo. Considerando que el cálculo de la dosis máxima de E171 es de alrededor de $10.4\text{mg/kg}_{\text{bw}}$ al día para niños mientras que para adultos es de $6.8\text{mg/kg}_{\text{bw}}$, se han realizado diversos estudios en ratones en los que se administra una dosis relevante para el consumo humano, estas dosis van desde $5\text{mg/kg}_{\text{bw}}$ 3 veces a la semana lo que, según los autores, equivale a $2\text{mg/kg}_{\text{bw}}$ al día hasta estudios en los que se han utilizado $10\text{mg/kg}_{\text{bw}}$ al día. Es por eso por lo que en el presente estudio se decidió administrar a los ratones con $10\text{mg/kg}_{\text{bw}}$ 3 veces a la semana para conseguir una dosis comparable con el consumo humano. Es importante destacar, que la dosis diaria calculada para humanos podría estar siendo subestimada ya que los cálculos se han realizado sólo a partir de alimentos en los que se indica la cantidad de Ti que contienen o en los que se ha cuantificado el Ti. Sin embargo, no se toman en cuenta las cantidades residuales que podrían estar acumuladas en mariscos (Grasso et al., 2020) o productos como el surimi (Yin et al., 2017). Además, la norma oficial mexicana (NOM-218-SSA1-2011) indica que E171 podría ser utilizado en tortillas y tostadas y tomando en cuenta que los mexicanos comemos hasta 75 kg de tortillas al año per cápita, la ingesta de E171 en la población mexicana podría ser incluso mayor a la anteriormente calculada en otras poblaciones como las de Estados Unidos y Europa. Por otro lado, debido a que en diversos artículos y en las evaluaciones de organismos como la EFSA, se ha demostrado la importancia de usar el E171 grado alimenticio y no solamente la fracción compuesta por NPs, en esta tesis se decidió usar el E171 obtenido de una empresa mexicana la cual es Sensient Colors. Otro aspecto importante por considerar fue la duración de la administración del E171. Con base en las recomendaciones de la EFSA en su re-evaluación en 2016, en las que indica que es necesario estudios de mayor duración, es decir de 90 días, así como la comparación de efectos entre hembras y machos, se decidió el diseño experimental en el que ratones macho y hembras, jóvenes y adultos fueron administrados con $10\text{mg/kg}_{\text{bw}}$ de E171 3 veces a la semana por 3 meses (capítulo 2).

Como primer acercamiento, cuantificamos la permeabilidad intestinal para saber el estado de la función intestinal de los ratones después de los 3 meses de administración del E171. Encontramos una mayor permeabilidad intestinal en ratones adultos, lo cual indicaba que habría alteraciones en el intestino por lo que realizamos histologías del íleon y del colon. Existen diversos factores que pueden afectar la permeabilidad intestinal, entre ellos cambios en la microbiota y se ha demostrado que el E171 puede inducir alteraciones en las familias de Firmicutes y Bacteroides en el colon (Pinget et al., 2019). Adicionalmente, el E171 disminuye la producción de mucina (Muc 2) lo cual evidencia su impacto en la homeostasis del colon (Pinget et al., 2019). Debido a que se sabe que el E171 podría dañar el DNA de células del colon, en este estudio hipotetizamos que, ya que los adultos tienen una menor capacidad de reparación del DNA, serían más susceptibles a la administración de este de manera oral. Efectivamente, encontramos que los adultos podrían ser más susceptibles a alteraciones en el colon e íleon, en los que se observó un aumento en el grosor de la capa muscular y la mucosa indicando que podría haber un aumento en la proliferación de las células. Lo cual comprobamos a través de la inmunofluorescencia de Ki67 en la que se observó un aumento de esta en ratones adultos administrados con E171. El aumento en la proliferación y por lo tanto el engrosamiento de las capas mucosa y muscular del colon de los ratones adultos podría ser debido a que el E171 puede inducir estrés oxidativo (Proquin et al., 2017) y las ROS participan en la señalización de procesos de proliferación (Basak et al., 2020). Además, la mayor proliferación puede estar relacionada a la mayor permeabilidad intestinal ya que hay una mayor superficie de absorción. Además, se encontró un aumento en la oxidación del DNA por medio de la inmunofluorescencia de 8-oxo en ratones macho adultos administrados con E171 por 3 meses, lo cual podría indicar que este aditivo induce estrés oxidativo que es capaz de dañar al DNA y aumenta la probabilidad de mutaciones.

Por otro lado, el estrés oxidativo es característico de las enfermedades intestinales inflamatorias crónicas, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa que promueven el desarrollo de cáncer de colon. Estas enfermedades pueden participar en el cáncer de colon de forma dependiente de ROS. Sin embargo, no solo el estrés oxidativo sino también algunos otros factores pueden inducir daño tisular y facilitar el desarrollo de malignidad en la

inflamación crónica (Basak et al., 2020). La mayor susceptibilidad encontrada en el colon de los ratones adultos hace sentido con el hecho de que en ratones adultos se ha demostrado que los sistemas de reparación del DNA disminuyen su eficiencia e incluso hay una menor expresión de las proteínas que están involucradas en los mismos (Watanabe et al., 2019). Por lo tanto, el E171 podría estar causando alteraciones en el DNA que no son reparadas eficientemente.

Las evidencias presentadas en esta tesis son novedosas al indicar que podría haber una población con mayor susceptibilidad como lo es la población adulta, y probablemente se deberían tomar medidas regulatorias al respecto. Es importante destacar el uso de E171 en multivitamínicos y bebidas que podrían ser altamente consumidos por la población adulta y que podría por lo tanto ser un factor de riesgo modificable para el desarrollo de enfermedades como el cáncer de colon. Además, este estudio sienta las bases para que en los estudios toxicológicos realizados con diversos aditivos y/o nanomateriales se tomen en cuenta distintas susceptibilidades de grupos poblacionales como jóvenes y adultos. Cabe destacar, que no fueron encontradas diferencias entre machos y hembras lo cual indica que, para efectos intestinales, puede ser una buena representación el uso indistinto de machos o hembras. Por otro lado, el engrosamiento del tejido colónico y el aumento de la permeabilidad intestinal en ratones sanos podrían ser indicadores de una mala prognosis en enfermedades intestinales o incluso que el E171 es un factor de riesgo para la disrupción del tejido lo que en tiempos más largos de exposición podría llegar a formar tumores.

Por otro lado, en modelos in vitro se ha demostrado que el E171 induce ROS y daño a DNA (Proquin et al., 2017). Sin embargo, aún existía la incógnita de cómo el E171 puede ocasionar estos efectos celulares, es decir si el daño a DNA es directo o por medio de la formación de ROS, lo cual además se relaciona con nuestro estudio en ratones en los que se encontró mayor oxidación del DNA en ratones adultos administrados con E171.

En diversos artículos se ha propuesto que el daño puede ser directo, sin embargo, en estos artículos el DNA es extraído de la célula y colocado directamente con el E171 o se han utilizado NPs de TiO₂ las cuales podrían tener una mayor permeabilidad en el núcleo de la célula que

el E171. En contraste, demostramos que el E171 no entra al núcleo de las células aún después de al menos dos divisiones celulares y que se localiza en la periferia del núcleo. Además, considerando el hecho de que el E171 está siendo prohibido en Europa y en especial en un modelo in vitro de células de colon (HCT116) se demostró la importancia de no sólo analizar los efectos inmediatos o agudos (24 h) de la exposición a E171 si no, de también evaluar la persistencia de estos efectos cuando se retira la exposición. Debido a la posible acumulación de partículas en las células, planteamos la hipótesis de que el efecto tóxico podría permanecer incluso después de la eliminación de E171. Por lo tanto, nuestro objetivo fue evaluar las alteraciones celulares causadas por E171 a las 24 h de exposición y 48 h post-exposición a E171 (capítulo 3).

La granularidad celular y la cuantificación de titanio son altas incluso 48 h post-exposición a E171 lo que indica que se encuentran internalizadas en las células y estas no lo liberan ni metabolizan. Además, encontramos un aumento de ROS, sin embargo, no es suficiente para activar enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y la catalasa. Esto es de interés ya que hay un aumento de ROS que es constante pero no es suficiente para activar sistemas antioxidantes ni disminuye la viabilidad de las células lo que quiere decir que las células se pueden continuar dividiendo y acumular daño oxidativo sin que este se repare o la célula se muera.

Adicionalmente, mostramos alteraciones en la huella molecular de ácidos nucleicos y lípidos, agrandamiento de núcleos, daño en el ADN y despolimerización de tubulina en ausencia de citotoxicidad tanto a las 24 h de exposición como incluso a las 48 h post-exposición a E171, además mostramos que el mecanismo del ADN el daño y el agrandamiento de los núcleos no se deben a la interacción directa de E171 con el ADN o la internalización en el núcleo. Las alteraciones celulares que persisten incluso 48 h post-exposición a E171 posiblemente estén asociadas con la baja liberación de E171 de las células y la generación leve pero sostenida de ROS, lo que significa que las células no se recuperan de las alteraciones causadas por la exposición a E171. Además, las alteraciones en la tubulina pueden explicar la formación de micronúcleos vista anteriormente tras la exposición a E171. Esto es debido a que la formación de micronúcleos puede estar relacionada a alteraciones en los microtúbulos durante la mitosis

lo que produce cromosomas rezagados o fragmentos de cromosomas rotos (ter Haar et al., 1996).

Los resultados de este estudio advierten sobre alteraciones sostenidas incluso si se interrumpe la exposición, lo que significa que los consumidores de E171 aún podrían estar en riesgo incluso después de eliminar el E171 de los alimentos. Abordar la toxicidad de los aditivos alimentarios que contienen NPs no solo debe tener en cuenta la toxicidad inmediata, sino también la capacidad de los organismos para recuperarse de los efectos iniciales de la exposición. Considerando lo observado en las células epiteliales de colon, en las que aun retirando la exposición se observa que el E171 no es expulsado de las células y las alteraciones celulares tanto moleculares como estructurales se mantienen, nos da la pauta para hipotetizar que en tiempos más largos y exposiciones repetidas estas alteraciones podrían acumularse. Es importante también destacar que estas alteraciones no llevaron a la disminución de la viabilidad celular y son cambios que se sabe que están involucrados en procesos de carcinogénesis como el daño al DNA, cambios en el citoesqueleto y producción de ROS por lo que las células podrían continuar su división acumulando estos daños y el E171 dentro de ellas.

4.1.1 REFERENCIAS

1. Basak, D., Uddin, M. N., Hancock, J. (2020). The Role of Oxidative Stress and Its Counteractive Utility in Colorectal Cancer (CRC). *Cancers*, 12(11), 3336. <https://doi.org/10.3390/cancers12113336>
2. Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J. D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., & Wells, J. M. (2014). Intestinal permeability a new target for disease prevention and therapy. *BMC gastroenterology*, 14, 189. <https://doi.org/10.1186/s12876-014-0189-7>
3. Grasso, A., Ferrante, M., Zuccarello, P., Filippini, T., Arena, G., Fiore, M., Cristaldi, A., Conti, G. O., & Copat, C. (2020). Chemical Characterization and Quantification of Titanium Dioxide Nanoparticles (TiO₂-NPs) in Seafood by Single-Particle ICP-MS: Assessment of Dietary Exposure. *International journal of environmental research and public health*, 17(24), 9547. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249547>
4. Pinget, G., Tan, J., Janac, B., Kaakoush, N. O., Angelatos, A. S., O'Sullivan, J., Macia, L. (2019). Impact of the Food Additive Titanium Dioxide (E171) on Gut Microbiota-Host Interaction. *Frontiers in Nutrition*, 6. doi:10.3389/fnut.2019.00057
5. Proquin, H., Rodríguez-Ibarra, C., Moonen, C. G., Urrutia Ortega, I. M., Briedé, J. J., de Kok, T. M., van Loveren, H., & Chirino, Y. I. (2017). Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis*, 32(1), 139-149. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew051>
6. Ter Haar, E., Day, B. W., & Rosenkranz, H. S. (1996). Direct tubulin polymerization perturbation contributes significantly to the induction of micronuclei in vivo. *Mutation research*, 350(2), 331-337. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00175-1](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00175-1)
7. Yin, C., Zhao, W., Liu, R., Liu, R., Wang, Z., Zhu, L., Chen, W., & Liu, S. (2017). TiO₂ particles in seafood and surimi products: Attention should be paid to their exposure and uptake through foods. *Chemosphere*, 188, 541-547. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.168>

4.2 CONCLUSIÓN

El consumo de E171 de forma subcrónica no provoca cambios en el peso de los órganos de ratones macho y hembras, sin embargo, puede inducir alteraciones histológicas en íleon y colon así como aumento de la permeabilidad intestinal en ratones adultos machos, además de aumento en la proliferación y daño oxidativo al DNA en los ratones adultos machos y hembras. En conclusión, los ratones adultos de ambos sexos presentan mayor susceptibilidad al consumo de E171 de forma subcrónica en dosis relevantes al consumo humano.

La exposición de células de colon (HCT116) a E171 por 24 h induce alteraciones celulares estructurales, como formación de ROS, aumento en el tamaño de núcleos, daño al DNA y despolimerización de tubulina las cuales se mantienen incluso 48 h post-exposición a E171. Todas estas alteraciones se dan de forma indirecta ya que el E171 se localiza en la región perinuclear de las células y no tiene una interacción directa con el DNA o el citoesqueleto.

4.3 PERSPECTIVAS

Ya que se encontró que el E171 al ser administrado por vía oral induce alteraciones histológicas principalmente en el colon de ratones macho adultos tras 90 días de administración, se recomienda realizar estudios con mayor duración de la administración para evaluar si estas alteraciones histológicas podrían dar lugar a neoplasias.

Además, debido a que se encontró que los adultos son más susceptibles a la administración por 90 días del E171, se podrían realizar estudios en los que se analice la razón de esta mayor susceptibilidad. Por otro lado, el hecho de que se haya encontrado un aumento en la permeabilidad del tracto gastrointestinal en adultos da lugar a preguntarnos si el consumo de E171 podría estar originando cambios en la microbiota y/o una mayor permeabilidad a patógenos y/o antígenos u otras sustancias contenidas en los productos alimenticios, por lo que se podrían realizar modelos en los que se administre el E171 con antígenos específicos como el gluten para investigar si la susceptibilidad a este aumenta.

Tomando en cuenta que la evidencia indica que las alteraciones causadas por la exposición a E171 pueden persistir incluso al retirar la exposición, se deben hacer estudios en ratones en donde se analice primero, la acumulación del E171 en distintos órganos y si esta acumulación persiste en los órganos tras meses de retirar la administración del aditivo por vía oral. Se recomienda hacer un curso temporal para poder hacer una propuesta de la biocinética del E171 en diversos órganos a través del tiempo.

Además, con la finalidad de mejorar las estimaciones de estudios toxicológicos y mejorar el ajuste con respecto al consumo humano, se recomienda realizar cuantificaciones de Ti en tortillas y tostadas las cuales son elementos básicos de la comida de los mexicanos y a partir de esto y los datos de otros productos alimenticios hacer un cálculo de la dosis diaria consumida por la población mexicana.

ANEXO

ARTÍCULOS PUBLICADOS Y CONGRESOS ASISTIDOS

A lo largo del trabajo para la realización de esta tesis se asistió a **siete congresos** y se publicó **un artículo** relacionado con este proyecto de investigación, los cuales se enlistan a continuación:

Artículos publicados

- Food grade titanium dioxide accumulation leads to cellular alterations in colon cells after removal of a 24-hour exposure. Rodríguez-Ibarra, C., Medina-Reyes, E. I., Déciga-Alcaraz, A., Delgado-Buenrostro, N. L., Quezada-Maldonado, E. M., Ispanixtlahuatl-Meráz, O., Ganem-Rondero, A., Flores-Flores, J. O., Vázquez-Zapién, G. J., Mata-Miranda, M. M., López-Marure, R., Pedraza-Chaverri, J., García-Cuéllar, C. M., Sánchez-Pérez, Y., & Chirino, Y. I. (2022). *Toxicology*, 153280. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153280>

Congresos asistidos

- Asistencia y participación de Cartel en el “8th International Nanotoxicology Congress” (Boston, Estados Unidos, 2016).
- Participación como Ponente en el XLVIII Coloquio Estudiantil de Tercera Etapa con el tema “Análisis de micronúcleos en células de cáncer colorrectal tratadas con dióxido de titanio grado alimenticio” en la FES Iztacala (Tlalnepantla, Edo. De México, 2016).
- Participación en trabajo titulado “Effect of Titanium Dioxide Food Grade (E171) in a Colorectal Carcinogenesis Murine Model” expuesto en la “Society of Toxicology’s 55th Annual Meeting” (Baltimore, Estados Unidos, 2016).

- Participación como ponente del trabajo titulado “Food grade titanium dioxide (E171) consumption in diet induced higher DNA damage in colon than in spleen and liver of mice” expuesto en la “Society of Toxicology’s 55th Annual Meeting” (Estados Unidos, 2017).
- Participación como ponente en 9th International Conference on Nanotoxicology (NanoTox 2018. Neuss, Alemania, 2018).
- Participación con Póster en la 61 Reunión Anual y ToxExpo de la Sociedad de Toxicología (SOT 2022. San Diego, California, 2022). **Apoyo PAEP**
- Participación con póster en el Coloquio de Investigación de la FES Iztacala con el tema “Suspende la exposición del aditivo alimenticio E171, no revierte las alteraciones previamente inducidas en células de colon” en la FES Iztacala (Tlalnepantla, Edo. De México, 2022).