



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA PREVENTIVA EN EL DESARROLLO DE CÁNCER DE  
COLON INDUCIDO POR AZOXIMETANO Y DEXTRÁN SODIO SULFATO EN RATONES  
BALB/CANNHSD COMPARANDO DOS INULINAS: UNA DE ACHICORIA Y UNA DE  
AGAVE METLIN**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**MVZ VANIA LORENA LIZÁRRAGA GRIMES**

**TUTORA**

**M EN C ISABEL GRACIA MORA  
FACULTAD DE QUÍMICA  
UNAM**

**DRA LAURA ROMERO ROMERO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
UNAM**

**DRA. SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
IPN**

**MÉXICO D.F. NOVIEMBRE 2015**



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.

El presente trabajo se realizó en el Bioterio (UNEXA) de la Facultad de Química Conjunto “E” de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la M en C Isabel Gracia Mora como tutora principal y de la Dra. Laura Romero Romero del departamento de Anatomopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México y la Dra. Sonia Mayra Pérez Tapia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

*A mi familia  
que son todo para mí.*

## Agradecimientos

A la M. en C. Isabel Gracia, tutora principal de esta tesis, jefa y amiga, por todo su apoyo profesional y personal.

A la Dra. Laura Romero, por sus enseñanzas, consejos y preocupación constante.

A la Dra. Mayra Tapia, por su apoyo y orientación en la realización de este trabajo.

A todo el personal de UNEXA: Lucy, Sol, Paco, Mabelita, Lilia, Héctor, Steph, Lulú, Cele y a todos mis compañeros, que de una forma u otra formaron parte de este trabajo y se convirtieron en parte importante de mi día a día. Gracias por todos los momentos compartidos.

A mi familia adoptiva en D.F, San Luis Potosí y Chihuahua, que me impulsaron en momentos difíciles, se convirtieron en mis ángeles y que sin ellos, no habría podido conquistar este sueño.

## Índice

### Contenido

Índice de cuadros

Índice de gráficas

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal	2
2.2. Inmunología de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII)	3
2.2.1. TNF $\alpha$	5
2.2.2. IL-10	5
2.3. Inflamación y cáncer	6
2.4. Patogénesis de la colitis asociada al cáncer de colon	6
2.5. Mucosa transicional por inducción de cáncer	7
2.6. Prevención de Enfermedad Inflamatoria Intestinal y Colitis asociada al Cáncer de Colon	8
2.6.1. Prebióticos	8
2.6.2. Inulina	9
2.6.2.1. Inulina de achicoria (Sinergy 1)	10
2.6.2.2. Inulina de agave (Metlin)	10
2.6.2.3. Beneficios de Metlin	11
2.6.2.4. Butirato	11
2.7. Microflora	13
2.7.1. Lactobacilos	14
2.7.2. Bifidobacterias	15
2.7.3. Coliformes	15
2.7.4. Clostridios	16
2.8. Modelo de inducción de cáncer por Azoximetano (AOM) y Dextrán Sodio Sulfato (DSS)	16

2.8.1. Azoximetano	16
2.8.2. Dextrán Sodio Sulfato	17
3. Hipótesis	19
4. Objetivos	20
4.1. Objetivo General	20
4.2. Objetivos particulares	20
5. Metodología	21
5.1. Animales	21
5.2. Reactivos	21
5.3. Modelo de inducción de cáncer	21
5.4. Pruebas a realizar en el estudio	22
5.4.1. Pesaje semanal	22
5.4.2. ELISA	22
5.4.3. Histopatología	23
5.5. Suplementación con inulina	24
5.6. Sacrificio	25
5.7. Análisis estadístico	27
6. Resultados	28
7. Discusión	39
8. Conclusión	43
9. Bibliografía	44
10. Anexos	48

**Índice Cuadros**

Cuadro N° 1. Suplementación con inulina	24
Cuadro N°2. Grupos experimentales	25
Cuadro N°3. Evaluación y manejo del dolor en animales en experimentación	26
Cuadro N°4. Resultados de histopatología. Conteo de pólipos	33
Cuadro N°5. Resultados histopatológicos (H&E)	36
Cuadro N°6. Resultados de peso del modelo lineal generalizado	48
Cuadro N°7. Análisis de verosimilitud para TNF $\alpha$ lavado de colon	48
Cuadro N°8. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$ lavado de colon por grupos	49
Cuadro N°9. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$ lavado de colon por muestra*grupo	50
Cuadro N°10. Análisis de verosimilitud para TNF $\alpha$ de colon	51
Cuadro N°11. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$ de colon por grupos	51
Cuadro N°12. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$ de colon por muestra*grupo	52
Cuadro N°13. Análisis de verosimilitud para TNF $\alpha$ lavado de yeyuno	53
Cuadro N°14. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$ lavado de yeyuno por grupos	54
Cuadro N°15. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$ de lavado de yeyuno por muestra*grupo	52
Cuadro N°16. Análisis de verosimilitud para TNF $\alpha$ de yeyuno	56
Cuadro N°17. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$ de yeyuno por grupos	56
Cuadro N°18. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$ de yeyuno por muestra*grupo	57



Cuadro N°19. Análisis de verosimilitud para IL-10 de lavado de colon	59
Cuadro N°20. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 lavado de colon por grupos	59
Cuadro N°21. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 de lavado de colon por muestra*grupo	60
Cuadro N°22. Análisis de verosimilitud para IL-10 de colon	61
Cuadro N°23. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 de colon por grupos	62
Cuadro N°24. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-0 de colon por muestra*grupo	62
Cuadro N°25. Análisis de verosimilitud para IL-10 lavado de yeyuno	64
Cuadro N°26. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 de lavado de yeyuno por grupos	64
Cuadro N°27. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 de lavado de yeyuno por muestra*grupo	65
Cuadro N°28. Análisis de verosimilitud para IL-10 de yeyuno	66
Cuadro N°29. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 de yeyuno por grupos	66
Cuadro N°30. Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 de yeyuno por muestra*grupo	67

## Índice Gráficas

Gráfica N° 1. Pesaje semanal	28
Gráfica N°2. Determinación de TNF $\alpha$ en lavado de colon	29
Gráfica N°3. Determinación de TNF $\alpha$ en raspado de mucosa de colon	29
Gráfica N°4. Determinación de TNF $\alpha$ en lavado de yeyuno	30
Gráfica N°5. Determinación de IL-10 en raspado de mucosa de yeyuno	30
Gráfica N°6. Determinación de IL-10 en lavado de colon	31
Gráfica N°7. Determinación de IL-10 en raspado de mucosa de colon	31
Gráfica N°8. Determinación de IL-10 en lavado de yeyuno	32
Gráfica N°9. Determinación de IL-10 en raspado de mucosa de yeyuno	32

**Evaluación de la eficacia preventiva en el desarrollo de cáncer de colon inducido por azoximetano y dextrán sodio sulfato en ratones BALB/cAnNHsd comparando dos inulinas: una de achicoria y una de agave Metlin**

**1. Resumen**

*Actualmente, se ha probado que los alimentos funcionales tienen grandes beneficios para el organismo. La inulina, es un prebiótico que mejora de manera integral la salud, a través de la modulación de la microbiota intestinal. En este trabajo, se utilizó un modelo de inflamación crónica intestinal asociado al desarrollo de cáncer de colon en ratones BALB/c AnNHsd machos, empleando azoximetano (AOM) y dextrán sodio sulfato (DSS) como agentes carcinógenos. Se administró dos tipos de inulinas, una de achicoria (Sinergy1) y una de agave (Metlin) con el objetivo de observar que tanto limitan la inflamación intestinal evitando así el desarrollo de cáncer.*

*Se formaron 7 grupos: 1. Pre-inducción Sinergy, 2. Pre-inducción Metlin, 3. Pre y Post Inducción Sinergy, 4. Pre y Post Inducción Metlin, 5. Post-inducción Sinergy, 6. Post-inducción Metlin, 7. Control, los grupos del 1 al 6 recibieron las dos inulinas en tres etapas diferentes, una antes de emplear los agentes carcinógenos, otra después y otros durante todo el estudio, el grupo control no recibió ningún tipo de inulina.*

*Se tuvo 3 tiempos de muestreo, a los 3, 7 y 9 meses a partir de la inyección con AOM y la administración del DSS. En cada uno de los tiempos, se realizó estudio histopatológico. En el muestreo 7 y 9 se midió por medio de la técnica de ELISA la interleucina 10 (IL-10) y el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ).*

*Los resultados de la histopatología mostraron modificaciones en la mucosa intestinal (crecimiento de pólipos, atrofia de vellosidades e hiperplasia de tejido linfoide), pero no hubo evidencia concluyente para comprobar el desarrollo de cáncer en el colon. Con respecto a las citocinas, hubo un incremento de IL-10 y de TNF $\alpha$  en el grupo control, los cuales no recibieron prebióticos en ninguna etapa a lo largo del estudio, sugiriendo que el uso de prebióticos como la inulina protege de manera sistémica al organismo.*

## 2. Introducción

El cáncer colorectal (CCR) es reconocido como una seria complicación de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Terzic, Grivennikov et al. 2010, Hu, Elinav et al. 2013, Zhiqin, Palaniappan et al. 2014). Los estudios epidemiológicos y clínicos indican que los pacientes que padecen colitis ulcerativa (CU) o la enfermedad de Crohn (EC), que son las dos más grandes formas de presentación de la EII incrementan el riesgo de desarrollar ese tipo de cáncer (Sepúlveda, Beltrán et al. 2008, Rizzo, Pallone et al. 2011, Kim, Sung et al. 2014). Uno de los factores que contribuye al desarrollo del CCR es la duración y la gravedad de inflamación de la mucosa colónica más que alguna disposición genética (Zhiqin, Palaniappan et al. 2014).

La EII es un síndrome multifactorial/poligénico, rodeado por una gran cantidad de condiciones inmunológicas (Perse y Cerar 2012, Actis, Pellicano et al. 2014) cuya etiología es aún desconocida (Andoh, Yagi et al. 2008, Sepúlveda, Beltrán et al. 2008). Esta enfermedad se caracteriza por inflamación continua de la mucosa, provocando que el sistema inmune presente una respuesta “anormal” hacia la microbiota intestinal, que funciona como variable crucial en el favorecimiento o la lucha contra la respuesta inflamatoria (Andoh, Yagi et al. 2008, Hu, Elinav et al. 2013, Actis, Pellicano et al. 2014)

Estudios epidemiológicos sugieren que el 70-80% de los diferentes tipos de cáncer colorectal pueden deberse a factores ambientales, incluyendo prácticas culturales, sociales y a estilos de vida (Klinder, Gleib et al. 2008, Uronis y Threadgill 2009, Perse y Cerar 2012). Se ha encontrado que la dieta es uno de los factores de riesgo modificables que influye en la microflora intestinal y en sus enzimas, con lo cual se puede prevenir enfermedades que afectan el tracto digestivo como la EII que favorece el desarrollo de cáncer de colon (Tanaka, Kohno et al. 2003, V. P. Gourineni 2011, Kim, Sung et al. 2014).

### 2.1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII)

Es una enfermedad idiopática del intestino que agrupa a la CU y a la EC. Estas dos difieren en su curso clínico, pronóstico, tratamiento y en su respuesta inmunológica. La CU es causada por células T cooperadoras atípicas mediadas por una respuesta inmune Th2, mientras que en la EC hay una activación prevalente de células Th1 con una alta expresión de TNF $\alpha$  (Tanaka, Kohno et al. 2003, Leóna, Garrote et al. 2006, Sepúlveda, Beltrán et al. 2008, Alex, Zachos et al. 2009, Rizzo, Pallone et al. 2011, Perse y Cerar 2012).

La EII afecta a una gran población en el mundo occidental y se ha ido incrementando en las últimas décadas. Se caracteriza por inflamación intermitente en el tracto gastrointestinal (Schwartz y Hadar 2014, Sarlos, Kovesdi et al. 2014 ). Durante el proceso inflamatorio continuo, los leucocitos infiltrados y activados producen citocinas pro-inflamatorias, moléculas conocidas por tener un rol muy importante en la inflamación de la mucosa intestinal (Heerd, Houston et al. 1994, Leóna, Garrote et al. 2006, Schwartz y Hadar 2014).

## 2.2. Inmunología de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII)

La principal función fisiológica del sistema inmune es proteger al hospedero contra patógenos. Tradicionalmente se ha dividido en inmunidad innata e inmunidad adquirida. La inmunidad innata es la primera línea de defensa, reconoce patógenos de forma genérica y no confiere inmunidad a largo plazo. La inmunidad adquirida entra en acción cuando la inmunidad innata falla, elabora una respuesta específica para cada agente infeccioso y guarda memoria de él.

El primer nivel de defensa del tubo digestivo lo constituye el epitelio intestinal, formado por una única capa de células epiteliales cilíndricas que presentan estrechas uniones celulares, de forma que crean una barrera prácticamente impenetrable para las macromoléculas (a excepción de los nutrientes y de los gérmenes invasivos). Además, todo ello está revestido por moco, que impide el paso hacia la lámina propia de agentes patógenos y antígenos intraluminales. En la EII la barrera mucosa está alterada, lo que permite el paso de los antígenos hacia la lámina propia (Martínez-Montiel y Muñoz-Yagüe 2006, Ullman y Itzkowitz 2011). El sistema inmunitario innato de la mucosa intestinal, a través de un conjunto de receptores, células y mediadores, es capaz de generar una respuesta inflamatoria o de inmunotolerancia (Sepúlveda, 2008; Correa, 2008).

En condiciones normales, las células involucradas en el desarrollo de las respuestas inmunes en el intestino son las células de Paneth, que secretan sustancias que protegen a las células troncales, ubicadas en las criptas, contra agentes patógenos (Sepúlveda, Beltrán et al. 2008). Los macrófagos son la segunda población celular del sistema inmune innato, desde el punto de vista funcional se dividen en dos grandes grupos: macrófagos tipo 1 (M1) y macrófagos tipo2 (M2). Los M1 se consideran proinflamatorios y secretan TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, que promueven la generación de linfocitos Th1, especies reactivas de oxígeno y derivadas de óxido nítrico y pueden destruir células tumorales. Los M2 secretan interleucinas antiinflamatorias como la IL-10, y factor de crecimiento semejante a insulina, promueven regeneración de tejidos y

angiogénesis. Es importante considerar que estas células pueden cambiar de fenotipo (Ochoa-Carrillo, 2013). Las células M captan antígenos de patógenos presentes en el lumen, los procesan y pueden entregarlos a células dendríticas inmaduras. Las células dendríticas son capaces de procesar antígenos y presentarlos a linfocitos T *naive*, ubicados en ganglios mesentéricos o placas de Peyer (Sepúlveda, Beltrán et al. 2008). Los linfocitos T se dividen en dos tipos de respuestas colaboradoras: la Th1 (inmunidad celular o retardada) y la Th2 (inmunidad humoral). Esta diferenciación se basó en el panel de citocinas que éstos eran capaces de secretar una vez activados, y con las que modulaban a diversos tipos celulares: los Th1 a los linfocitos secretores de interferón (IFN-g) e interleucina 2 (IL-2) y se denominó Th2 a los linfocitos que liberan IL-4 e IL-13 (Serrano, 2009).

Existe un tercer tipo de células colaboradoras y desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos. Asimismo, se ha descubierto que tienen un efecto pro-inflamatorio que les permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la adaptativa (Bettelli et al 2007, Matsuzaki 2007). Los diferentes tipos de células colaboradoras se inactivan mutuamente, de modo que los Th1 inhiben selectivamente la actividad de los Th2 y los Th17. A su vez, los Th17 inhiben la proliferación de los Th1 y los Th2 mediante la IL-10 y la IL-4, y los Th17 inhiben a Th1 y Th2 (Ivanov 2007).

El exceso de células T efectoras conduce a una sobreproducción de citocinas proinflamatorias destinadas a eliminar el agente patógeno. Cuando esto se consigue, hay una liberación de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 que detienen la respuesta inflamatoria. Un defecto en este mecanismo inhibitorio conduce a una grave respuesta inflamatoria tisular. La abundancia de células T reguladoras, por el contrario, determina la tolerancia inmune y la anergia (Martínez-Montiel y Muñoz-Yagüe 2006, Alex, Zachos et al. 2009). La hiperfunción de las células Th17 se ha asociado a procesos inflamatorios crónicos, principalmente por el efecto proinflamatorio de la IL-17 que potencializa a su vez la actividad de IL-1 y TNF $\alpha$ .

La red de citocinas en la EII es un sistema complejo y dinámico en el que las citocinas, quimiocinas, y factores de crecimiento regulan la iniciación y perpetuación de la inflamación (Alex, Zachos et al. 2009, Ullman y Itzkowitz 2011). Hasta la fecha, la comprensión de la función de citocinas en la EII (en ambos modelos humanos y animales) ha sido limitada en gran medida a los análisis individuales o pequeños conjuntos de citocinas. La desregulación patofisiológica de la respuesta inmunológica a los antígenos bacterianos comensales que sucede en EII se refleja en un cambio dramático y desbalanceado en la producción del perfil de

citocinas en las diferentes etapas del progreso de la enfermedad (Rogler y Andus 1998, Alex, Zachos et al. 2009, Philip, Zachos et al. 2009, Terzic, Grivennikov et al. 2010).

La EII se caracteriza por su cronicidad, evolución con recaídas, complicaciones y limitada eficacia terapéutica médica. Actualmente su tratamiento es sólo sintomático a través del uso de moduladores de la inflamación e inmunosupresores de elevado costo y, en muchos casos, de evolución clínica desfavorable. Por estas razones, el estudio de los mecanismos que participan en su patogénesis es relevante y prioritario, pues puede orientar hacia el desarrollo de mejores herramientas diagnósticas y de tratamiento. Al respecto, la inmunología se abre paso como una poderosa herramienta de conocimiento sobre la etiología de las EII (Sepúlveda, Beltrán et al. 2008).

#### **2.2.1. TNF $\alpha$**

El factor de necrosis tumoral es una citocina clave en la patogénesis de la EII (Rizzo, Pallone et al. 2011, Schwartz y Hadar 2014) y a pesar de que se ha considerado como un agente anticáncer, se ha reconocido que la elevada expresión de ésta molécula puede promover el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis (Balkwill 2006, Ullman y Itzkowitz 2011, Rizzo, Pallone et al. 2011, Hijová, Szabadosova et al. 2013). En modelos de inflamación crónica donde se trataron ratones con Dextrán Sodio Sulfato (DSS), se liberó una gran cantidad de TNF $\alpha$  de las muestras de tejido de colon, como se espera al provocar un cierto nivel de inflamación (Rogler y Andus 1998, Tanaka, Kohno et al. 2003, Leóna, Garrote et al. 2006, Schwartz y Hadar 2014). TNF $\alpha$  también tiene la capacidad de causar ruptura en la barrera del epitelio colónico, provocando daño tisular (Terzic, Grivennikov et al. 2010, Sarlos, Kovesdi et al. 2014)

#### **2.2.2. IL-10**

La interleucina 10 es una citocina inmunomoduladora cuya principal función biológica es la de limitar o detener la respuesta inflamatoria. Los datos experimentales indican que la IL-10 puede jugar un papel importante en la patogénesis de EII y en la colitis asociada al cáncer colorectal (CACC). TNF $\alpha$  (Rizzo, Pallone et al. 2011). La regulación de la intrincada red de citocinas del sistema inmune está controlado por IL-10, su función es interferir la síntesis de las citocinas TNF $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, y GM-CSF por células T y regular negativamente la síntesis de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$  por macrófagos, aunque dependiendo

del estado de la enfermedad TNF $\alpha$  puede permanecer elevada (Roller, Femia et al. 2004, Philip, Zachos et al. 2009, Hernández-Urzúa 2001).

Esta citocina es producida por muchas células, tales como monocitos, células T, células B, células NK, macrófagos (M2), y células dendríticas. Previene la presentación de antígeno y la subsecuente liberación de células proinflamatorias, (Rogler y Andus 1998, Leóna, Garrote et al. 2006, Sarlos, Kovesdi et al. 2014 )

### 2.3. Inflamación y cáncer

La interacción entre las células epiteliales y las células inflamatorias probablemente es crucial para el proceso de inflamación asociado al desarrollo de cáncer. La inflamación crónica puede afectar directamente las células que eventualmente se transforman, esto es, se piensa que puede inducir displasia a través de modificaciones en el DNA en el epitelio intestinal. La acumulación crónica de células inmunes activadas como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas es acompañada por la liberación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que son conocidas por provocar mutaciones genómicas, supervivencia celular, angiogénesis, migración celular y promoción del crecimiento tumoral. Además se asocia a la inflamación crónica con la metilación del DNA y la modificación de histonas (Tanaka, Kohno et al. 2003, Rizzo, Pallone et al. 2011 , Schwartz y Hadar 2014).

La inflamación también contribuye a la proliferación incontrolada y a la migración de células neoplásicas. Por lo tanto, podemos decir que la severidad de la inflamación está directamente relacionada al riesgo de desarrollar cáncer en enfermos de EII (Schwartz y Hadar 2014).

### 2.4. Patogénesis de la colitis asociada al cáncer colorectal (CACC)

La patogenia de CACC es un mecanismo complejo y diverso que involucra rutas moleculares múltiples y factores que incluyen la dieta alta en grasas y baja de fibra, una vida sedentaria, factores de riesgo genético, humo de tabaco, consumo de alcohol y obesidad (Terzic, Grivennikov et al. 2010, Zhiqin, Palaniappan et al. 2014).

Inmunológicamente, habrá un incremento en la producción de citocinas inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-15, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  y los miembros de la familia del IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27) entre otros, por las células inmunes infiltradas en la mucosa intestinal de pacientes con EII. Se piensa que el balance entre las citocinas pro y anti-inflamatorias es crítico, y la



sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias se ha asociado al CACC (Zhiqin, Palaniappan et al. 2014).

Histológicamente se considera que la patogénesis de esta enfermedad involucra una secuencia de pasos que va desde la inflamación y el epitelio hiperplásico hasta una displasia y finalmente a la formación de un adenocarcinoma, aunque el mecanismo aún no está claro. También se observa una mayor cantidad de células caliciformes e incremento de moco. Típicamente las lesiones neoplásicas primero se presentan como una cripta aberrante focal (ACF) o microadenomas que se desarrollan hasta la formación de adenomas grandes, luego a un carcinoma *in situ* y finalmente a un adenocarcinoma invasivo (Schwartz y Hadar 2014).

La inestabilidad cromosómica, microsatelital y la hipermetilación del DNA son características genéticas que ocurren en el CACC. A diferencia de la mucosa colónica normal, las células de la mucosa intestinal inflamada poseen estas alteraciones genéticas antes de que ocurra evidencia histológica, displasia o cáncer. La razón de estas anomalías es desconocida, pero es posible que el estrés oxidativo esté relacionado en algún grado. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producidas por células inflamatorias pueden afectar la regulación de genes que codifican factores que previenen la carcinogénesis, como *p53*, las proteínas reparadoras de DNA, factores transcripcionales, etc. (Rizzo, Pallone et al. 2011, Zhiqin, Palaniappan et al. 2014). Se necesitan linfocitos para promover el crecimiento tumoral en un contexto de colitis (Rizzo, Pallone et al. 2011).

## 2.5. Mucosa transicional por inducción de cáncer

El significado biológico de la mucosa transicional (MT) no está claro. Se piensa que podría ser una respuesta pre-neoplásica a un estímulo carcinogénico a partir del cual se desarrolla una neoplasia (Sawady, Friedman 1991, Tanaka, Kohno et al. 2003).

Histológicamente, las glándulas de la mucosa transicional están alargadas y ramificadas. Se observa aumento de las sialomucinas y alteración en las proporciones relativas de los distintos tipos celulares a lo largo de la cripta con persistencia de células inmaduras en niveles altos de las criptas. Las células caliciformes están aumentadas en número y tamaño (Dawson, 1976).

La mucosa transicional podría ser:

- a. Una respuesta específica de la mucosa colónica a cualquier factor irritante.

- b. Una respuesta de la mucosa específica a la presencia del carcinoma, un cambio inducido por una neoplasia adyacente.
- c. Respuesta pre-neoplásica a un estudio carcinogénico a partir del cual las neoplasias colónicas podrían desarrollarse.
- d. Este cambio podría reflejar la diseminación intraluminal del tumor colónico (Bibbo, Michelassi et al. 1990)

Muchos estudios han sugerido que la inflamación crónica o repetitiva de la mucosa puede resultar en el desarrollo de cáncer mediante mecanismos como la inducción de mutaciones genéticas, el incremento de la proliferación de las células de las criptas, cambios en la circulación enterohepática del ácido biliar, cambios en el metabolismo de las células de las criptas y alteraciones en la flora bacteriana. Estas ideas son consistentes con la hipótesis de que la inflamación crónica puede estar relacionada con neoplasias malignas epiteliales en el intestino grueso (Tanaka, Kohno et al. 2003). En ratones, el rol de la inflamación crónica en CRC se demostró al descubrir que la administración prolongada de dextrán sodio sulfato (DSS) resultaba en una colitis crónica y la formación de displasia de alto grado. Una simple dosis de azoximetano (AOM) que es un carcinógeno colónico, seguido por la administración de DSS resulta en el desarrollo y crecimiento de un tumor (Uronis y Threadgill 2009).

## **2.6. Prevención de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) y Colitis Asociada al Cáncer de Colon (CACC)**

Tanto EII como CACC son enfermedades multifactoriales, en las que influyen de manera directa factores ambientales externos, como el estilo de vida y la alimentación, por lo que se han propuesto teorías en donde al modificar la dieta se pueden obtener resultados favorables para la prevención o terapia de estos padecimientos. La fibra dietética es un buen candidato para el papel protector en cáncer de colon previniendo la colitis crónica. El efecto protector de la fibra dietética consistiría en un aumento en la masa fecal y dilución de ácidos biliares y otros carcinógenos fecales, además tiene un efecto prebiótico (Maslowski y Mackay 2011).

### **2.6.1. Prebióticos**

Un prebiótico es una sustancia no digerible presente en un alimento (son resistentes a los ácidos gástricos y a la hidrólisis por enzimas de mamíferos, son fermentados por la flora

intestinal benéfica). Sus efectos positivos en el organismo se deben a una estimulación selectiva del crecimiento y a la actividad de la microbiota intestinal (Pérez-Conesa, López et al. 2004, Rebolé, Ortiz et al. 2010, Delzenne, Neyrinck et al. 2013). Entre los prebióticos podemos encontrar al fructano tipo inulina (Madrigal y Sangronis 2007).

### 2.6.2. Inulina

Ha habido un debate continuo sobre si la adición de fibra soluble a la dieta está relacionada con la disminución del riesgo de padecer cáncer de colon (Greenwald, Clifford et al. 2001, Seifert y Watzl 2007, Klinder, Gleis et al. 2008, V. P. Gourineni 2011).

Dentro de las fibras que se han estado adicionando, se encuentran los fructanos tipo inulina, los cuales se han catalogado como “fibra funcional”, con base en una nueva clasificación de la fibra dietética que considera el efecto fisiológico en el individuo (Madrigal y Sangronis 2007). Estos fructanos son únicos debido a su naturaleza química y a la combinación de sus efectos que influyen en las funciones gastrointestinales (Cross 2002, Rebolé, Ortiz et al. 2010).

Debido a su configuración química, los fructanos no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas del hombre y los animales, por lo que permanecen intactos en su recorrido por la parte superior del tracto gastrointestinal, pero son hidrolizados y fermentados en su totalidad por las bacterias de la parte inferior del tracto gastrointestinal (intestino grueso, colón). De esta manera, este tipo de compuestos se comportan como fibra dietética (Madrigal y Sangronis 2007, Seifert y Watzl 2007, Maslowski y Mackay 2011).

La propiedad de la inulina más extensivamente estudiada es su comportamiento como prebiótico, definido por su capacidad selectiva de estimular el crecimiento de un grupo de bacterias en el colon (bifidobacterias y lactobacilos), con la consecuente disminución de otras especies que pueden ser perjudiciales (como *E. coli* y bacterias de la especie *Clostridium spp*) (Brady, Gallaher et al. 2000, Pérez-Conesa, López et al. 2004, Pérez-Conesa, López et al. 2004, Rebolé, Ortiz et al. 2010). Además, contribuye a la disminución de los niveles lipídicos y de glucosa (se recomienda en la dieta de individuos con diabetes), tiene acción laxante, estimula el sistema inmune, ayuda al incremento de la absorción de calcio y magnesio con consecuencias positivas en la densidad de los huesos previniendo enfermedades como la osteoporosis en humanos (Ishibashi, Yaeshima et al. 1997,

Madrigal y Sangronis 2007, Maslowski y Mackay 2011, Hu, Elinav et al. 2013). Todos estos beneficios han llevado a que la inulina también se utilice como coadyuvante en la industria de la alimentación animal (Madrigal y Sangronis 2007). En las aves, la inulina ya se está utilizando como parte de su dieta para evitar enfermedades como *Salmonella* spp., *E. coli* y *Campilobacter jejuni* (Rebolé, Ortiz et al. 2010) y para aumentar la capacidad digestiva y de absorción de los nutrientes (debido a que la inulina aumenta la longitud de las vellosidades).

#### 2.6.2.1. *Inulina de achicoria*

La achicoria (*Chicorium intybus*) es una planta herbácea perenne, de la familia de las Asteráceas, que mide entre 80 y 90 cm de alto. La inulina obtenida de esta planta está formada por cadenas lineales de carbohidratos polidispersos compuestos principalmente por moléculas de fructosa unidas por enlaces  $\beta$ -(2→1) fructosil-fructosa (Madrigal y Sangronis 2007, Rebolé, Ortiz et al. 2010).

#### *Sinergy 1*

Es una combinación de oligofructosa e inulina en una proporción de 30:70 en peso, para que tenga características funcionales específicas que se obtienen de la achicoria. Químicamente se trata de una cadena lineal de moléculas de fructosa (de 20 a 60), con una molécula de fructosa terminal (Pérez-Conesa, López et al. 2004, V. P. Gourineni 2011).

#### 2.6.2.2. *Inulina de agave*

Los fructanos son los principales productos fotosintéticos generados por las plantas de agave. Metlin® es un fructano orgánico extraído y purificado del agave azul. Su principal diferencia con los fructanos comerciales que se encuentran ahora en el mercado, es su estructura molecular, la cual ha sido investigada por el Dr. Werner Praznik (2011), de la Universidad de Recursos Naturales y Ciencias Aplicadas (BOKU), de Viena, utilizando cromatografía y análisis de metilación. Metlin® contiene fructanos con un grado de polimerización arriba de 10 y un contenido bastante bajo de mono y disacáridos. Es una molécula ramificada, por lo tanto es bastante soluble en agua fría a

diferencia de la inulina obtenida de achicoria que tiende a precipitarse en una solución a baja temperatura (Mora).

#### 2.6.2.3. *Beneficios de Metlin*

El principal beneficio es la capacidad de la inulina de modular la flora intestinal, esto se debe a su efecto prebiótico, ya que a diferencia de los carbohidratos más conocidos, que se disuelven en el intestino delgado para convertirse en energía, la inulina pasa por el intestino delgado hasta el colon, donde estimula el crecimiento de "bacterias buenas".

Las cadenas cortas de ácidos grasos (acetato, propionato y butirato) y el lactato son metabolitos benéficos de la microflora intestinal (Pérez-Conesa, López et al. 2004, Maslowski y Mackay 2011). El butirato tiene una participación a nivel de la mucosa intestinal, ya que mantiene su integridad, participa en su reparación ante procesos ulcerativos, y reduce el riesgo de proliferación de células cancerosas (mantiene un fenotipo normal). El lactato se convierte en otros ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente butirato, cuando existe una fermentación acelerada. Por lo tanto, en *Metlin*<sup>®</sup> no se observa mucha producción de lactato, esto significa que la fermentación, especialmente en comparación con la inulina de achicoria y otros fructanos sintéticos, ocurre en el colon (Greenwald, Clifford et al. 2001, Pérez-Conesa, López et al. 2004, Rebolé, Ortiz et al. 2010).

#### 2.6.2.4. *Butirato*

Múltiples estudios epidemiológicos y en animales de experimentación han demostrado que la ingesta de una dieta rica en fibra y compuestos hidrocarbonados se relaciona con un menor riesgo y mortalidad por cáncer colorectal (Howe, Benito et al. 1992, McIntyre, Gibson et al. 1993, Pérez-Conesa, López et al. 2004, Madrigal y Sangronis 2007). La fibra, el almidón resistente y los fructosoligosacáridos escapan a la digestión en el estómago e intestino delgado y sufren un proceso de fermentación anaerobia en el colon, produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC), fundamentalmente ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico (Cummings 1990, Cavaglieria, Nishiyama et al. 2003, Rebolé, Ortiz et al. 2010). Aproximadamente el

95-99% de los AGCC son rápidamente absorbidos y metabolizados por los colonocitos, para los que son su principal fuente de energía, ejerciendo además otras acciones entre las que se incluyen aumento del flujo sanguíneo colónico, aumento de la absorción de sodio y agua, estimulación de la producción de moco y disminución del pH en la luz del colon (Mortensen y Clause, 1996).

De los tres se ha observado que es el ácido butírico el que tiene los efectos más importantes sobre las células epiteliales colónicas, tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que actualmente se le reconoce como el principal componente protector de las dietas ricas en fibra frente a la carcinogénesis colónica (McIntyre, Gibson et al. 1993, Singh, Halestap et al. 1997, Cavaglieria, Nishiyamab et al. 2003).

El principal papel del butirato en relación con su propiedad antitumoral radica en sus efectos sobre el crecimiento, diferenciación y apoptosis de los colonocitos (Bailón, M et al. 2010). En este sentido, ejerce una serie de acciones sobre las que se fundamenta dicho efecto antineoplásico:

- Detiene el crecimiento de los colonocitos neoplásicos en una gran variedad de líneas celulares derivadas de cáncer de colon. El epitelio colónico es un sistema dinámico con células madre localizadas en la base de la cripta colónica que proliferan y migran hacia la superficie de la misma, donde se diferencian completamente, siguiendo en último lugar muerte celular por apoptosis. El proceso de la carcinogénesis rompe esta migración ordenada, de manera que las células continúan la proliferación y migración hacia la superficie de las criptas, no presentando las características de diferenciación normal y, ocasionalmente, invadiendo la membrana basal. Aunque los mecanismos que regulan esta proliferación, diferenciación y apoptosis están intrínsecamente programados, también están sujetos a la modulación por factores externos como los AGCC. El butirato, a concentraciones fisiológicas de 1-10 mmol/l, detiene el crecimiento de los colonocitos neoplásicos en fase G1 del ciclo celular en múltiples líneas celulares en cultivo (Gamet, Daviaud 1992, Young, Gibson 1994) e *in vivo*, donde la experiencia es más limitada (Velazquez, 1996).

- Actualmente se cree que la carcinogénesis colorectal es un proceso de múltiples pasos que resulta, en parte, de la acumulación de alteraciones en determinados genes, oncogenes y genes supresores, cuyas proteínas forman parte de la red de transmisión de señales que operan desde la membrana citoplasmática hasta el núcleo y que controlan la proliferación y diferenciación celular (Czerniak, Herz et al. 1987). El butirato bloquea la proliferación celular neoplásica al modificar la expresión de algunos de estos genes implicados en el proceso de transmisión de señales: inhibe los protooncogenes *ras*, *src* y *c-myc* e induce la expresión de los protooncogenes *c-fos* y *c-jun* (Saemann, Bohmig et al. 2000, Pérez-Conesa, López et al. 2004).
- El efecto antiinflamatorio del butirato induce la apoptosis, un acontecimiento importante en la carcinogénesis colorectal, en varias líneas celulares derivadas de adenomas y carcinomas de colon (Maslowski y Mackay 2011). Esta apoptosis es independiente de p53 y existen evidencias de que ocurre como etapa final del proceso de diferenciación (la apoptosis dependiente de p53 en respuesta al daño del DNA ocurre por otra vía distinta de la diferenciación terminal) (Heerdt, Houston et al. 1994).

## 2.7. Microflora

El intestino constituye una extensa superficie de mucosa con vellosidades, microvellosidades y criptas, especialmente diseñadas para aumentar el área de contacto y favorecer la absorción de nutrientes que provienen principalmente de los alimentos. Los componentes del intestino interactúan con los alimentos como también con más de 400 especies diferentes de bacterias comensales, que se alojan en la mucosa (Ishibashi, Yaeshima et al. 1997, Sepúlveda, Beltrán et al. 2008, Muniz, Knosp et al. 2012). Debido al gran número de bacterias presentes en el intestino, el sistema inmune debe ser capaz de diferenciar entre comensales y patógenos, y generar adecuadas respuestas de tolerancia o inflamación respectivamente (Brady, Gallaher et al. 2000, Sepúlveda, Beltrán et al. 2008).

La flora intestinal es un conjunto de microorganismos, en su mayoría bacterias, algunas que resultan beneficiosas y otras que resultan dañinas para nuestro organismo. Esta flora la tenemos desde nuestro nacimiento, pero a lo largo de la vida es normal que sufra diversos cambios provocados por los distintos hábitos alimenticios, enfermedades, uso de antibióticos y medicinas, etc. Las funciones de este conjunto de bacterias son variadas y entre ellas podemos mencionar las de fermentar los residuos de los alimentos, estimular y regular el sistema inmunitario y actuar como barrera frente a las bacterias patógenas (Ishibashi, Yaeshima et al. 1997, Maslowski y Mackay 2011, Panga, Xie et al. 2012).

La microbiota intestinal tiene gran importancia médica ya que las bacterias pueden influir de forma beneficiosa o dañina sobre la salud del hospedador. Entre los posibles efectos perjudiciales se deben considerar las infecciones intestinales, infecciones extraintestinales, carcinogénesis, en el desarrollo de colitis (Brady, Gallaher et al. 2000, Ullman y Itzkowitz 2011, Perse y Cerar 2012) es clave para la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal y al cáncer colorectal asociado a colitis (Hu, Elinav et al. 2013)

En condiciones normales el ecosistema intestinal está en equilibrio y los microorganismos perjudiciales no ejercen su poder patógeno; sin embargo, en determinadas situaciones, éstos pueden dar lugar a infecciones y enfermedades si se establecen en regiones del cuerpo en las que no son residentes habituales o cuando su número se incrementa de forma excesiva debido a perturbaciones del ecosistema intestinal (Ishibashi, Yaeshima et al. 1997, Panga, Xie et al. 2012). Se sabe ahora que la microbiota intestinal influye en la respuesta adaptativa e innata del sistema inmune de manera completamente diferente (Maslowski y Mackay 2011). Dentro de las bacterias más comunes se encuentran los lactobacilos, bifidobacterias, coliformes y clostridios (Ishibashi, Yaeshima et al. 1997, Rebolé, Ortiz et al. 2010).

### 2.7.1. *Lactobacilos*

Los lactobacilos son bacilos o coco-bacilos Gram-positivos que frecuentemente forman cadenas. Son catalasa negativos, no esporulados y en general inmóviles (unas pocas especies presentan flagelos peritricos). Es un género muy amplio en el que se incluyen más de 100 especies con propiedades heterogéneas. El pH óptimo de crecimiento oscila entre 5,5 y 6,2. Son anaerobios aerotolerantes y su crecimiento se ve favorecido en atmósfera microaerófila con un 5-10% de CO<sub>2</sub> (Klander, Weiss 1986). Forman ácido láctico



como producto principal de la fermentación de los azúcares. Sus necesidades nutritivas son complejas, y la mayor parte de las cepas no puede cultivarse en los medios nutritivos ordinarios, a menos que se enriquezcan con glucosa y suero. Las necesidades individuales de aminoácidos varían de 2 a 15; en general, se requiere piridoxina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido fólico y ácido nicotínico, variando las necesidades en cada caso (Axelsson, 1998, Cross, 2002).

### 2.7.2. *Bifidobacterias*

Las bifidobacterias son microorganismos Gram-positivos, anaerobios estrictos (aunque el grado de sensibilidad al oxígeno depende de la especie), inmóviles, no esporulados y catalasa negativos. Presentan una gran variedad de formas: cocoide, con protuberancias y/o bifurcaciones, con extremos espatulados o cadenas estrelladas. Su nombre hace referencia a las formas bífidas con dos ramas en Y o V que presentan en ocasiones (Axelsson, 1998). Originalmente las nombraron *Bacillus bifidus communis*, después se le consideró como una especie de Lactobacilos, por producir ácido acético y láctico a partir del metabolismo de los azúcares. A medida que se fue profundizando en las investigaciones, se descubrió que este organismo era incapaz de reproducirse en presencia de oxígeno, por esta razón se clasificó en el grupo anaerobio obligado *Bifidobacterium*, que comprende más de 30 especies (Ishibashi, Yaeshima et al. 1997).

Su efecto fisiológico consiste en su acción en las condiciones intestinales, mejorando la microflora, inhibe las sustancias putrefactas del intestino, mejora las propiedades fecales y el estado de defecación (alivia la constipación o la diarrea) y tiene un efecto bactericida que suprime a las bacterias dañinas. El efecto de activación del sistema inmune es también muy importante, se reporta que las bifidobacterias inducen la resistencia inespecífica a toxinas y tienen efecto antitumoral (Ishibashi, Yaeshima et al. 1997, Ullman y Itzkowitz 2011).

### 2.7.3. *Coliformes*

Son Bacilos Gram negativos, aerobias o anaerobias facultativas, no son esporógenas, fermentan la lactosa a 37°C en 48 hrs produciendo ácido láctico y gas. La mayoría de los coliformes pueden encontrarse en la flora normal del tracto digestivo del hombre o animales, por lo cual son expulsados especialmente en las heces, por ejemplo *Escherichia*

*coli*. Por esta razón, su presencia constante en la materia fecal, pues los coliformes son el grupo más ampliamente utilizado en la microbiología de alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas.

Como los coliformes también pueden vivir en otros ambientes, se distingue entre coliformes totales y coliformes fecales, éstos son capaces de reproducirse a temperaturas entre 44 y 44,5 °C. Su termotolerancia se debe a una superior estabilidad de las proteínas al calor y es así porque normalmente se encuentran en el tracto entérico de los animales.

Estas bacterias pueden crecer en agar Mc Conkey, Bilis y Rojo Violeta (Pascual, Calderón 1999).

#### 2.7.4. Clostridios

Este género está compuesto por aproximadamente 150 especies, filogenéticamente heterogéneas. Son bacilos Gram positivos, pleomórficos y relativamente grandes, la mayoría móviles. Son ubicuos y forman parte de la flora intestinal de animales y hombre. Son capaces de formar esporas resistentes al calor y a los desinfectantes. Los miembros de este género *Clostridium* son reconocidos como patógenos entéricos para humanos, animales domésticos y vida salvaje. Entre las especies patógenas más conocidas se encuentran *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani* y *C. difficile* (Songer, 1996).

### 2.8. Modelo de inducción de cáncer por Azoximetano (AOM) y Dextrán Sodio Sulfato (DSS)

Se han desarrollado diferentes modelos para la inducción de tumores en intestino por distintos carcinógenos. En este proyecto de tesis, se utilizó dextrán sodio sulfato (DSS) y azoximetano (AOM) (Suzuki, Kohno et al. 2006, Uronis y Threadgill 2009, Kim, Sung et al. 2014) para crear un modelo de inflamación crónica asociado a cáncer colorectal.

#### 2.8.1. Azoximetano (AOM)

El azoximetano es un inductor específico de cáncer de colon, iniciando este proceso por alquilación del DNA, facilitando el apareamiento erróneo de bases nitrogenadas. Sin embargo es necesario que sufra diferentes procesos ya que no es el metabolito carcinogénico final (Gourineni, 2011, Kim, Sung et al. 2014).

El mecanismo de acción consiste en que el azoximetano, una vez inyectado, se convierte en metilazoximetanol mediante un proceso de N-hidroxilación. El metilazoximetanol es químicamente inestable a temperatura corporal e *in vitro* se descompone espontáneamente en formaldehído, agua y nitrógeno. Durante esta descomposición se forma el agente alquilante metildiazonio, que es el carcinógeno final. Este último es una sustancia altamente reactiva que forma iones metil-carbono, que se cree que son responsables de las metilaciones de macromoléculas tanto *in vivo* como *in vitro*. La alteración de las propiedades de las macromoléculas críticas como DNA, RNA y otras proteínas, por alquilación y otras reacciones, es un paso esencial en la carcinogénesis química (Ward, 1974, Gourineni, 2011, Kim, Sung et al. 2014).

En relación al metabolismo *in vivo*, los estudios indican que parte del AOM administrado se excreta a través de la respiración y en la orina. La evaluación de residuos o compuestos derivados del metabolismo del AOM en homogenizado de hígado resultaron positivos, indicando que éste es un órgano clave para la transformación de este compuesto. Al parecer los metabolitos activos no son transportados mediante las heces hasta el colon, sino que llegan a este órgano mediante el torrente sanguíneo.

El metilmetoximetanol, derivado del AOM, es una especie altamente reactiva que puede generar especies capaces de metilar macromoléculas, mediante la formación de puentes de hidrógeno, reacción que puede ser catalizada por enzimas específicas de ciertos tejidos (Kim, Sung et al. 2014).

El AOM produce una toxicidad hepática de hasta un 20% y los animales fallecen durante el periodo de inducción debido a necrosis hepática (Tanaka, Kohno et al. 2003, Suzuki, Kohno et al. 2006). Los roedores hembras son ligeramente menos susceptibles que los machos a la acción carcinogénica de la DMH o del AOM (Turusov, Lanko et al. 1988).

### 2.8.2. Dextrán Sodio Sulfato (DSS)

El uso de dextrán sodio sulfato, un agente químico que promueve la inflamación y es especialmente útil en modelos de estudio en el que se aborda la progresión tumoral asociada a colitis crónica, al administrarlo en conjunto con Azoximetano, se da un crecimiento acelerado de tumores en el colon distal (Tanaka, Kohno et al. 2003, Suzuki, Kohno et al. 2006). Este agente tiene la capacidad de romper la barrera epitelial,

provocando que los macrófagos se activen para eliminar los residuos de la microflora, liberando citocinas inmunomoduladoras y produciendo inflamación y daño tisular (Alex, Zachos et al. 2009, Perse y Cerar 2012, Kim, Sung et al. 2014). El DSS es resistente a la degradación de la microflora y a los cambios de pH (Perse y Cerar 2012).

Para el presente estudio se compararon dos tipos de inulina, una de agave (Metlin) contra una de achicoria (Sinergy 1), con el objetivo de valorar su efecto como moduladores de la inflamación usando un modelo animal que pretende reproducir en diferentes etapas del desarrollo de la inflamación asociado al cáncer, provocado principalmente por los malos hábitos adquiridos en la actualidad. El modelo animal seleccionado pretende reproducir este largo proceso inflamatorio, lo que nos permitió observar el papel que tienen las inulinas (prebióticos) como moduladores de la inflamación.

### 3. Hipótesis

- El uso de inulina en la dieta diaria de ratones con inflamación intestinal crónica aumenta los niveles de IL-10, disminuye TNF $\alpha$ , evita la formación de pólipos en el intestino y previene enfermedades como la CACC o EII.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo General

Evaluación del efecto de la inulina de agave Metlin sobre un proceso inflamatorio crónico intestinal asociado al desarrollo de cáncer de colon, comparándolo con la inulina de achicoria Sinergy 1

### 4.2. Objetivos particulares

- Se determinará el papel que juegan Sinergy 1 y Metlin en la respuesta inmune midiendo citocinas por medio de la técnica de ELISA y el daño en el tejido intestinal por histopatología.
- Comparar el efecto entre Metlin (inulina de agave) contra Sinergy 1 (inulina de achicoria), que es la que se encuentra de manera comercial.

## 5. Metodología

### 5.1. Animales

Se utilizaron 105 ratones macho de la cepa BALB/cAnNHsd de 5 semanas de edad que fueron alojados bajo condiciones ambientales controladas que incluyen extracción e inyección de aire con 18 recambios por hora; éste se realizó mediante filtros HEPA filtrándose partículas hasta de 5  $\mu\text{m}$  en el aire de inyección. La temperatura se mantuvo a  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y la humedad relativa en 55%, los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12/12 hrs. Se les proporcionó alimento Harlan Teklad 2018 S para ratón/rata y agua filtrada hasta 0.22  $\mu\text{m}$  y clorada hasta 10 ppm *ad libitum*, las jaulas para su alojamiento fueron de acrílico cristal transparente con las siguientes dimensiones: 19 x 10.5 x 8cm. (1 caja para 5 ratones), la cama (Harlan Pine Shaving) se cambió cada tercer día, los bebederos se lavaron un día a la semana y se esterilizaron.

### 5.2. Reactivos

Se utilizó Azoximetano (AOM) y dextrán sodio sulfato (DSS) como agentes inductores de cáncer. El DSS se eligió con un peso molecular de 36 000-50 000 Da de acuerdo al modelo elegido (Suzuki, Kohno et al. 2006).

Se empleó suplemento alimenticio en polvo a base de inulina de agave Metlin como producto de prueba e inulina de achicoria Synergy 1 como producto de referencia.

### 5.3. Modelo de inducción de cáncer

El modelo de cáncer utilizado como base para este trabajo fue tomado del artículo publicado por Rikako Suzuki (Suzuki, Kohno et al. 2006) del Departamento de Oncología Patológica de la Universidad Médica de Kanazawa, eligiéndose por su reporte de un 100% de adenocarcinomas en ratones BALB/cAnNHsd con la menor dosis del agente inductor.

A la novena semana de edad, se administró una inyección intraperitoneal de Azoximetano (AOM) a una dosis de 10 Mg/Kg x PV, seguido de una administración de DSS al 2% en agua de

bebida durante 4 días. Este experimento duró 18 semanas después de la administración de AOM y se realizó histopatología para revisar los cambios en la mucosa. En este trabajo, se decidió alargar el tiempo post administración del AOM-DSS a 40 semanas y se formaron subgrupos para que por medio de histopatología, se observaran los cambios tisulares y la evolución del proceso inflamatorio asociado al cáncer.

#### 5.4. Pruebas a realizar en el estudio

- Pesaje semanal
- Determinación de IL-10 y TNF $\alpha$  por medio de ELISA
- Análisis histopatológico de colon

##### 5.4.1. *Pesaje semanal*

Se pesaron a los animales cada semana para revisar que su ganancia de peso y su crecimiento fuera adecuado a su edad además, se consideró el peso como un valor de referencia (como indicador directo) en caso de algún signo o síntoma asociado a alguna alteración intestinal.

##### 5.4.2. *ELISA*

Se midieron los niveles de interleucina 10 (IL-10) y de TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral) de yeyuno y de colon de acuerdo al trabajo de Emilia (2013), se tomó esta decisión al no observar cambios tisulares en el primer muestreo a los 3 meses y con el fin de recabar mayor información para determinar el desarrollo de la inflamación.

##### Protocolo de ELISA

##### *Preparación de la muestra*

Se lavó el tejido con PBS frío, se recuperó el lavado y se congeló a -20°C. Las muestras de colon y de yeyuno ya lavadas se infiltraron con PBS frío y se congelaron a la misma temperatura.

##### *Técnica de ELISA*



Las muestras de tejido fueron procesadas de la siguiente manera:

1. Los segmentos de tejido se abrieron longitudinalmente, y las mucosas fueron recuperadas por raspado y homogenizadas en 0.5 mL de PBS (pH: 7.2).
2. Las muestras procesadas fueron centrifugadas a 12000 g por 20 minutos a 4°C. En el caso de los infiltrados de tejido gastrointestinal únicamente se les añadió el volumen correspondiente de PBS.
3. Los sobrenadantes recolectados fueron almacenados a -70°C hasta la determinación de TNFa e IL-10.

Para cuantificar el nivel de citocinas en el sobrenadante de muestras de tejido y de la mucosa del tejido gastrointestinal se siguieron las indicaciones del proveedor de los siguientes kits para ELISA:

Citocina Marca Catálogo Lote

- Mouse TNFa BD 555268 3017983
- Mouse IL-10 BD 555252 3217950

Y se hicieron las lecturas de absorbancia en el lector de microplacas EPOCH de la marca Biotek a una longitud de onda de 450 nm y una lectura de corrección a 570 nm. Los datos obtenidos fueron analizados con el software Gen5 del lector de microplacas.

#### 5.4.3. ***Histopatología***

##### *Preparación de la muestra*

Muestras de tejido gastrointestinal fijado en formol amortiguado al 10% durante 24 hrs.

##### Protocolo de histopatología

Las muestras de tejido ya fijadas, se incluyeron en el procesador automatizado de tejidos para luego elaborar bloques de parafina, a partir de los cuales se realizaron cortes de 3 a 5µ de espesor mediante el uso del micrótopo. Los cortes microscópicos se colocaron en

láminas portaobjetos, se desparafinaron en la estufa y se procedió a realizar la coloración con Hematoxilina & Eosina (Thomas, 1995), para su observación en el microscopio óptico.

### 5.5. Suplementación con inulina

Durante el experimento se comparó el efecto que tuvieron los animales que fueron suplementados con inulinas, con respecto al grupo control que no recibió suplementación, y además se comparó el efecto de dos tipos de inulinas desde un punto de vista preventivo, así como terapéutico. Las inulinas se administraron en el agua de bebida y se proporcionaron *ad libitum*.

Los grupos experimentales se formaron de acuerdo a la suplementación con inulinas quedando de la siguiente manera:

**Cuadro N°1. Suplementación con Inulina**

Grupo	Tratamiento	# animales	Administración de inulina
1	Synergy 1 pre-inducción	15	Previa a la inyección con AOM (4 semanas)
2	Metlin pre-inducción	15	Previa a la inyección con AOM (4 semanas)
3	Synergy 1 pre y post inducción	15	Administración continua (45 semanas)
4	Metlin pre y post inducción	15	Administración continua (45 semanas)
5	Synergy 1 post-inducción	15	Después de la inyección con AOM al término del proyecto (40 semanas)
6	METLIN post-inducción	15	Después de la inyección con AOM al término del proyecto (40 semanas)
7	Grupo Control	15	No se les proporcionó inulina

Cada uno de los grupos se dividió en 3 subgrupos con 5 animales cada uno, para tener 3 tiempos de muestreo después de la inyección con azoximetano para poder valorar los avances en el proceso de carcinogénesis. Los grupos quedaron de la siguiente manera:

**Cuadro N°2. Grupos experimentales**

Grupo	Subgrupo	N° de animales	Tiempo de muestreo
1- Synergy 1 pre-inducción	1	5	3 meses
	2	5	7 meses
	3	5	9 meses
2- Metlin pre-inducción	1	5	3 meses
	2	5	7 meses
	3	5	9 meses
3 - Synergy 1 pre y post inducción	1	5	3 meses
	2	5	7 meses
	3	5	9 meses
4 - Metlin pre y post inducción	1	5	3 meses
	2	5	7 meses
	3	5	9 meses
5 - Synergy 1 post-inducción	1	5	3 meses
	2	5	7 meses
	3	5	9 meses
6 – Metlin post-inducción	1	5	3 meses
	2	5	7 meses
	3	5	9 meses
7 – Grupo Control	1	5	3 meses
	2	5	7 meses
	3	5	9 meses

### 5.6. Sacrificio

Se sacrificaron los animales mediante el uso de una cámara de CO<sub>2</sub>, procedimiento aceptado por la NOM-062-ZOO-1999, y se practicó la necropsia en los tiempos indicados para la obtención de muestras de tejido para su estudio histopatológico.

Debido a que el protocolo tuvo una larga duración, diariamente se hizo una revisión detallada de los animales para identificar algún signo clínico que demostrara dolor, siguiendo las

recomendaciones del American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM 2006). Se utilizó esta tabla como referencia para establecer el dolor como criterio de eutanasia:

**Cuadro N°3. Evaluación y el manejo del dolor en roedores y conejos (ACLAM, 2006)**

Categoría	Signos	Valoración
<b>Peso corporal</b>	Normal	0
	<9% pérdida	1
	10-15% pérdida	3
	>16% pérdida	8
<b>Apariencia</b>	Normal	0
	Acicalado pobre	1
	Pelaje descuidado, descarga nasal/ocular, diarrea	3
	Pelaje mal estado, postura anormal, anemia, ictericia, hemorragia	6
	Midriasis, cianosis, signos nerviosos centrales, letargia marcada y persistente	7
<b>Constantes vitales</b>	Normal	0
	Modificaciones escasas	1
	Cambio de temperatura 1-2°C, taquicardia/taquipnea >30%	2
	Cambio de temperatura >2°C, taquicardia/taquipnea >50% o muy reducida	8
<b>Comportamiento espontáneo</b>	Normal	0
	Cambios leves	1
	Anormal, movilidad reducida, alerta reducida, inactivo	4
	Vocalización, automutilación, inmóvil	8
	Temblor cabeza, tembor, espasticidad, parálisis, convulsión, marcha en círculos, ataxia	10
<b>Comportamiento en respuesta a</b>	Normal	0

<b>estímulos</b>	Depresión leve o respuesta exagerada	1
	Respuestas anormales moderadas	3
	Reacciones violentas, convulsiones o coma	10

**RATA**

<b>Peso/tamaño tumor</b>	<i>Peso corporal (gr)/diámetro(cm)</i>						
	500	400	300	200	100	gr	
	2,0	1,8	,01,8	1,3	1,1	cm	2
	4,0	3,6	3,0	2,6	2,3	cm	5
	6,0	5,5	4,5	4	3,5	cm	10

<b>RATÓN</b>	<i>Peso corporal (gr)/diámetro(cm)</i>				
	75	50	25	gr	
<b>Peso/tamaño tumor</b>	1,0	0,8	0,7	cm	2
	2,0	1,7	1,4	cm	5
	3,0	2,5	2,0	cm	10

**TOTAL**

Si los animales en experimentación excedían el puntaje de 10, se procedió a practicar el sacrificio humanitario sin importar el tiempo de experimentación que llevaran.

**5.7. Análisis estadístico**

Se utilizó el programa SPSS versión 19 utilizando, para la gráfica de pesos, las medias y desviaciones estándar, y para el análisis de IL-10 y de TNF $\alpha$  mediante la técnica de ELISA mediante un modelo lineal generalizado con una estimación de máxima verosimilitud y utilizando una significancia menor a 0.05

## 6. Resultados

A lo largo del ensayo, el tamaño de la muestra “*n*” de cada grupo fue afectado debido a complicaciones provocadas por el modelo empleado para la inducción del cáncer, algunos animales murieron rápidamente mientras que otros presentaron dolor abdominal, diarrea e impactación, éstos últimos fueron tratados sintomáticamente para aliviarlos y los que excedieron un puntaje de 10 empleando los criterios de eutanasia propuesto por ACLAM, fueron sacrificados. Otros animales murieron por canibalismo, provocados por la larga duración del proyecto, por lo que hubo que realizar aislamientos para evitar mayores pérdidas.

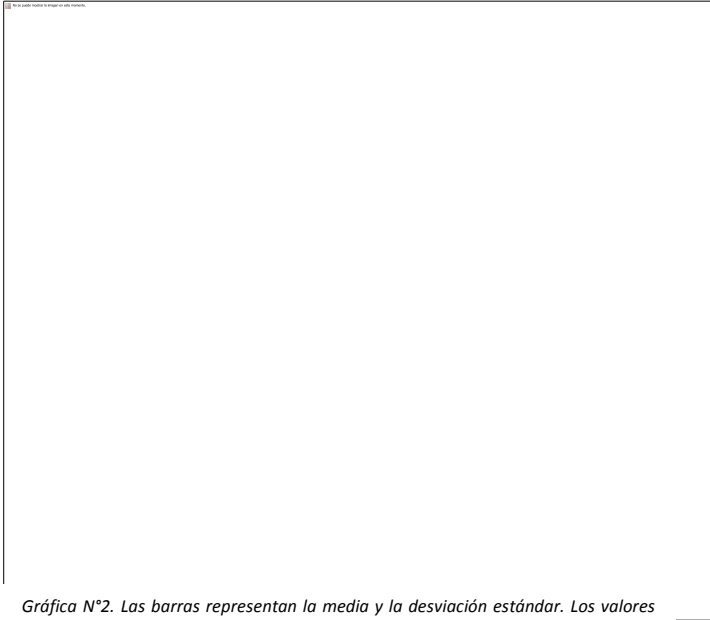
**Gráfica 1. Pesaje semanal de ratones a lo largo del estudio**



Existe una diferencia significativa entre los diferentes grupos del modelo experimental, así como una diferencia entre los pesajes a lo largo del estudio, la cual es esperada debido a la prolongada duración de la investigación. En la intersección de grupo pesaje, no se encontró diferencias entre cada grupo, no fue relevante analizándola contra el tiempo. Se observa que a pesar de encontrar estadísticamente las diferencias significativas, principalmente con los grupos suplementados con Sinergy1, éstas en realidad no varían mucho de la media general.

## TNF $\alpha$

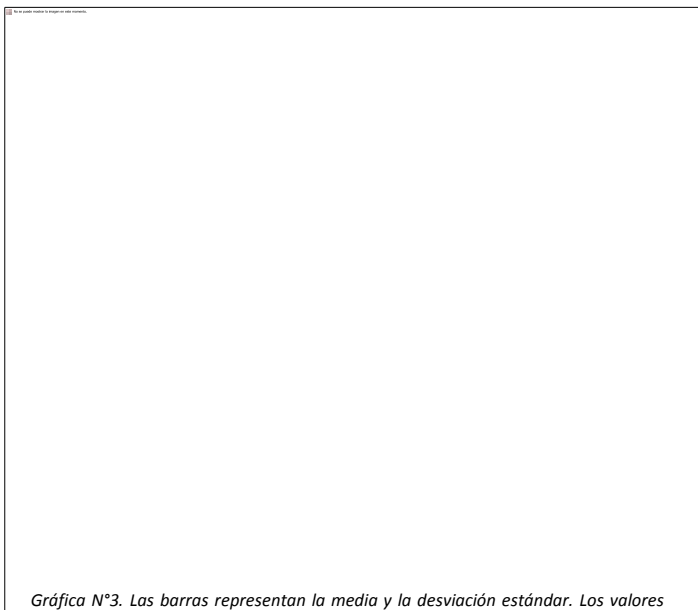
### Gráfica N°2. Determinación de TNF $\alpha$ en lavado de colon en ratones



Gráfica N°2. Las barras representan la media y la desviación estándar. Los valores más altos se obtuvieron en el grupo control en el tiempo 3 (1306.92 pg/ml) seguido por el mismo grupo en el tiempo 2 (1119.21 pg/ml). Significancia >0.05.

En la Gráfica N°2 se puede ver que el valor más alto de TNF alfa (pg/mL) se obtuvo en el tiempo 3 (9 meses) del grupo control, el que le sigue hacia abajo es el del mismo grupo en el tiempo 2 (7 meses), mientras que el valor más bajo se obtuvo con la prevención y tratamiento con Metlin en el tiempo 3 (9 meses), siguiéndole el grupo de prevención y tratamiento con Sinergy en el tiempo 2 (7 meses).

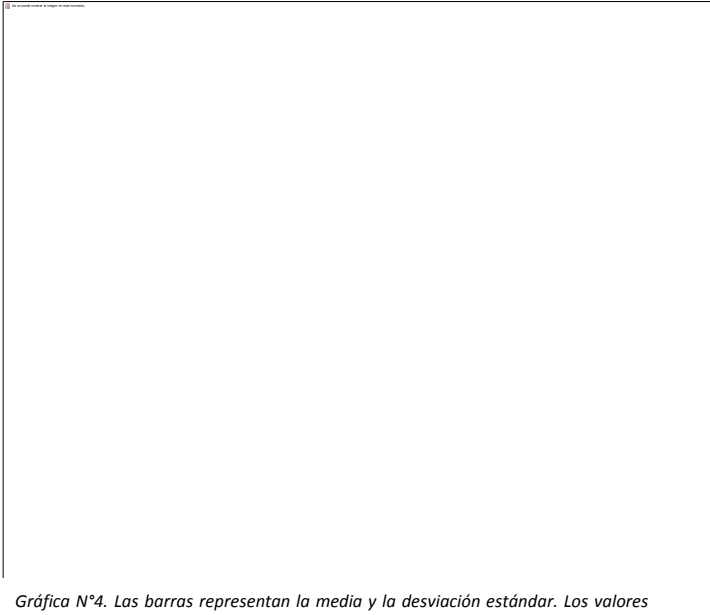
### Gráfica N°3. Determinación de TNF $\alpha$ en mucosa de colon en ratones



Gráfica N°3. Las barras representan la media y la desviación estándar. Los valores más altos se obtuvieron en el grupo control en el tiempo 2 (1152.36 pg/ml) seguido por el mismo grupo en el tiempo 3 (1053.23 pg/ml). Significancia >0.05

En la Gráfica N°3 se puede ver que el valor más alto de TNF alfa (pg/mL) se obtuvo en el tiempo 2 (7 meses) del grupo control, el que le sigue hacia abajo es el del mismo grupo en el tiempo 3 (9 meses), mientras que el valor más bajo se obtuvo en la prevención con Sinergy en el tiempo 3 (9 meses), siguiendo la prevención con Metlin en el tiempo 2 (7 meses). De manera similar a los resultados de la prueba obtenida con el lavado de colon, se puede observar como el grupo control mantiene los niveles de TNF $\alpha$  más alto con respecto al resto de los grupos ( $p < 0.001$ ).

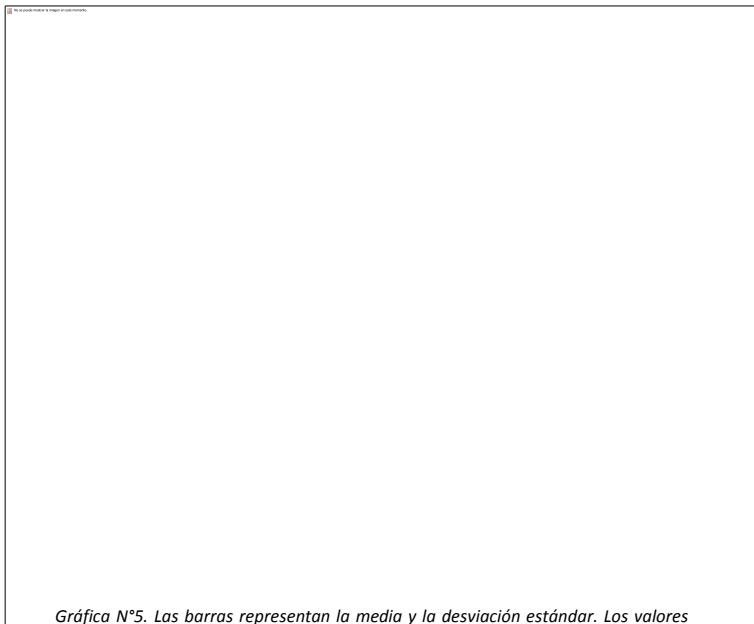
#### Gráfica N°4. Determinación de TNF $\alpha$ en lavado de yeyuno en ratones



Gráfica N°4. Las barras representan la media y la desviación estándar. Los valores más altos se obtuvieron en el grupo control en el tiempo 3 (1377.71 pg/ml) seguido por el mismo grupo en el tiempo 2 (910.89 pg/ml). Significancia >0.05

En la Gráfica N°4 se puede observar que el valor más alto de TNF alfa (pg/mL) se obtuvo en el tiempo 3 (9 meses) del grupo control, el que le sigue hacia abajo es el del mismo grupo en el tiempo 2 (7 meses), mientras que el valor más bajo se obtuvo en la prevención con Sinergy en el tiempo 3 (9 meses), siguiendo la prevención y tratamiento con Sinergy en el tiempo 3 (9 meses).

#### Gráfica N°5. Determinación de TNF $\alpha$ en mucosa de yeyuno en ratones



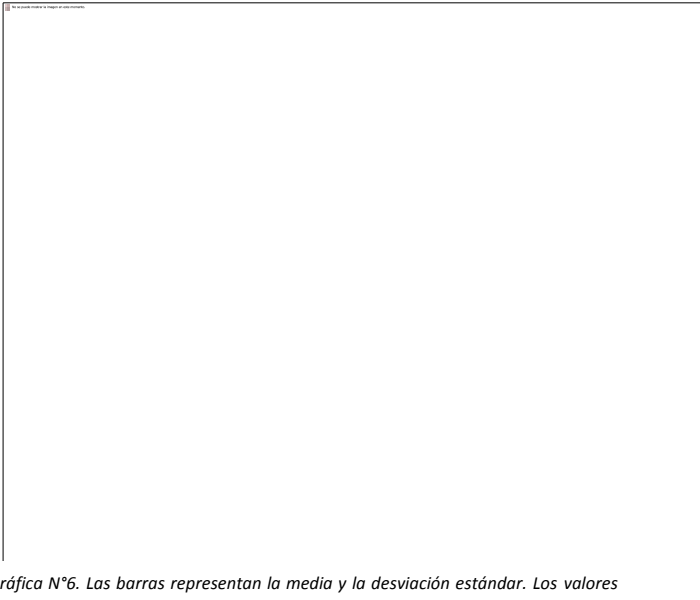
Gráfica N°5. Las barras representan la media y la desviación estándar. Los valores más altos se obtuvieron en el grupo control en el tiempo 3 (1163.23 pg/ml) seguido por el mismo grupo en el tiempo 2 (901.94 pg/ml). Significancia >0.05

En la Gráfica N°5 se puede observar que el valor más bajo se obtuvo en la prevención y tratamiento con Metlin en el tiempo 3 (9 meses), siguiendo la prevención con Metlin en el mismo tiempo de muestreo. El valor más alto de TNF alfa (pg/mL) se obtuvo en el tiempo 3 (9 meses) del grupo control el que le sigue hacia abajo es el mismo grupo en el tiempo 2 (7 meses).



## IL-10

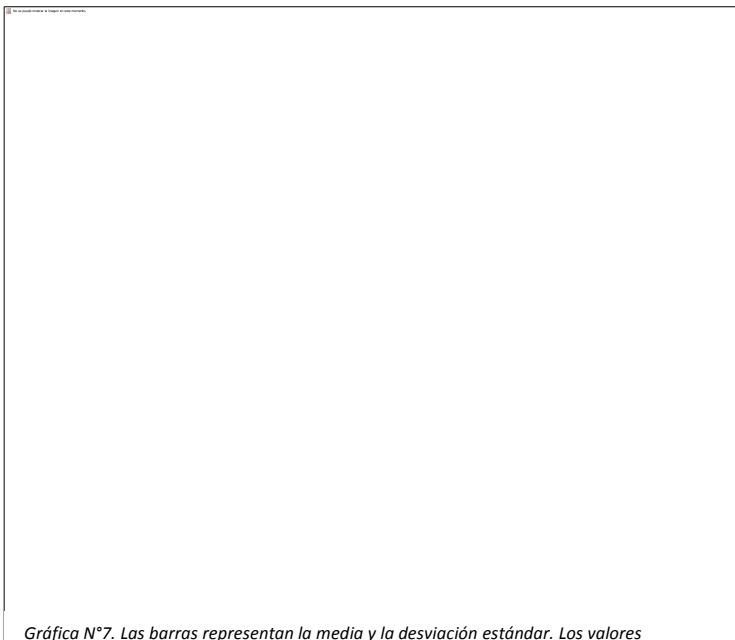
### Gráfica N°6. Determinación de Interleucina 10 (IL-10) en lavado de colon de ratones



Gráfica N°6. Las barras representan la media y la desviación estándar. Los valores más altos se obtuvieron en el grupo control en el tiempo 2 (1952.55 pg/ml) seguido por el mismo grupo en el tiempo 3 (1871.19 pg/ml). Significancia >0.05

En la Gráfica N°6 se puede observar que el valor más bajo de IL-10 se obtuvo en la prevención y tratamiento con Metlin en el tiempo 3 (9 meses), siguiendo la prevención y tratamiento con Sinergy en tiempo 3 (9 meses). El valor más alto de IL-10 (pg/mL) se obtuvo en el tiempo 2 (7 meses) del grupo control, el que le sigue hacia abajo es el mismo grupo en el tiempo 3 (9 meses).

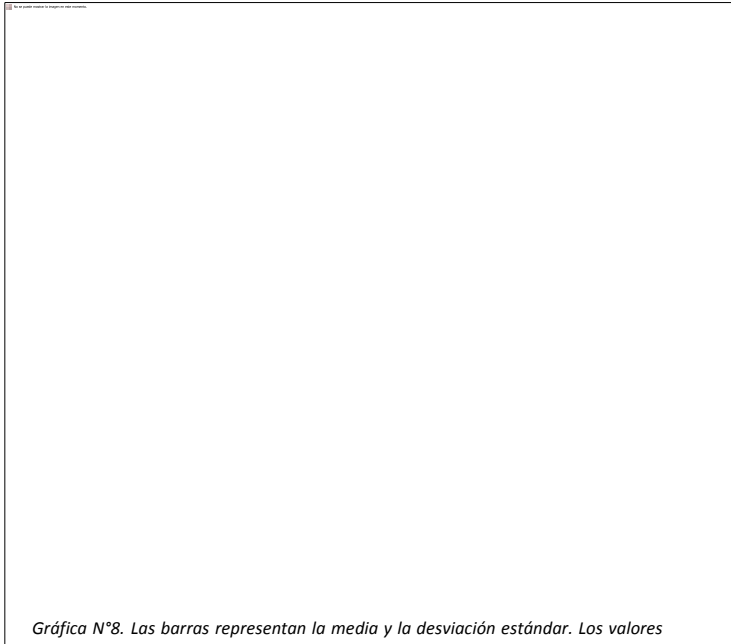
### Gráfica N°7. Determinación de Interleucina 10 (IL-10) en colon de ratones



Gráfica N°7. Las barras representan la media y la desviación estándar. Los valores más altos se obtuvieron en el grupo control en el tiempo 2 (2115.66 pg/ml) seguido por el mismo grupo en el tiempo 3 (1791.50 pg/ml). Significancia >0.05

En la Gráfica N°7 se puede observar que el valor más bajo de IL-10 se obtuvo en la prevención con Sinergy en el tiempo 3 (9 meses), siguiendo la prevención y tratamiento con Sinergy en tiempo 3 (9 meses). El valor más alto de IL-10 (pg/mL) se obtuvo en el tiempo 2 (7 meses) del grupo control, el que le sigue hacia abajo es el mismo grupo control en el tiempo 3 (9 meses).

### Gráfica N°8. Determinación de Interleucina 10 (IL-10) en lavado de yeyuno de ratones



Gráfica N°8. Las barras representan la media y la desviación estándar. Los valores más altos se obtuvieron en el grupo control en el tiempo 2 (1895.00 pg/ml) seguido por el mismo grupo en el tiempo 3 (1817.05 pg/ml). Significancia >0.05

En la Gráfica N°8 se puede observar que el valor más bajo de IL-10 se obtuvo en la prevención y tratamiento con Sinergy en el tiempo 3 (9 meses), siguiendo la prevención y tratamiento con Metlin en el tiempo 3 (9 meses). El valor más alto de IL-10 (pg/mL) se obtuvo en el tiempo 2 (7 meses) del grupo control el que le sigue hacia abajo es el mismo grupo control en el tiempo 3 (9 meses).

### Gráfica N°9. Determinación de Interleucina 10 (IL-10) en yeyuno de ratones



Gráfica N°9. Las barras representan la media y la desviación estándar. Los valores más altos se obtuvieron en el grupo control en el tiempo 2 (2226.99 pg/ml) seguido por el mismo grupo en el tiempo 3 (1901.225 pg/ml). Significancia >0.05

En la Gráfica N°9 se puede observar que el valor más bajo de IL-10 se obtuvo en el tratamiento con Sinergy en el tiempo 3 (9 meses), siguiendo la prevención y tratamiento con Sinergy en el tiempo 3 (9 meses). El valor más alto de IL-10 (pg/mL) se obtuvo en el tiempo 2 (7 meses) del grupo control, el que le sigue hacia abajo es el mismo grupo control en el tiempo 3 (9 meses).

**Histopatología**

En la necropsia los hallazgos macroscópicos no fueron muy relevantes. En algunos casos se alcanzó a observar la formación de pólipos en intestino, el resto de órganos no presentó cambios

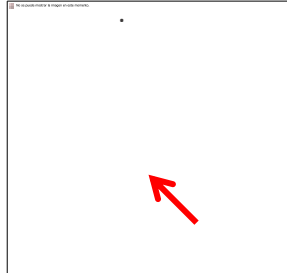


Foto N°1. Se observa macroscópicamente un engrosamiento de la mucosa intestinal

En el siguiente cuadro se enlista la cantidad de pólipos encontrados en cada grupo:

**Cuadro N° 4. Conteo de Pólipos**

Grupo	Nombre del grupo	Tiempo de muestreo	Ratón	N° de pólipos
1	Sinergy 1 pre-inducción	3 meses	1	-
			4	-
			5	++
			14	+++
2	Metlin pre-inducción	3 meses	16	-
			17	+++
			18	+
3	Sinergy 1 pre y post inducción	3 meses	31	-
			32	++
			33	-
4	Metlin pre y post inducción	3 meses	47	+++
			48	-
			49	+++
5	Sinergy 1 post-inducción	3 meses	61	+
			62	-
			63	+++
6	Metlin post-inducción	3 meses	76	+++

			77	+
			78	+++
			90	++
7	Control	3 meses	91	+++
			93	+
			94	+
			95	+++
1	Sinergy 1 pre-inducción	7 meses	3	+
			7	++
			8	+++
			9	+
2	Metlin pre-inducción	7 meses	21	++
			22	++
			24	+++
3	Sinergy 1 pre y post inducción	7 meses	34	++
			35	++
			36	+
			37	+
			39	+
4	Metlin pre y post inducción	7 meses	50	-
			52	+
			53	-
5	Sinergy 1 post-inducción	7 meses	65	+
			66	+++
			67	+
6	Metlin post-inducción	7 meses	79	++
			80	+++
			81	++
			82	++
			89	++
7	Control	7 meses	96	+++

			97	+++
			98	+++
			99	+++
			100	+++
1	Sinergy 1 pre-inducción	9 meses	10	+
			11	+
			13	-
			15	-
2	Metlin pre-inducción	9 meses	25	+
			28	+
3	Sinergy 1 pre y post inducción	9 meses	40	+
			41	-
			42	-
			43	-
			45	+
4	Metlin pre y post inducción	9 meses	54	+
			57	+
			58	-
			59	-
5	Sinergy 1 post-inducción	9 meses	69	+
			70	+++
			71	+++
			72	+++
6	Metlin post-inducción	9 meses	83	+
			84	+
			85	++
			87	+++
			88	+++
7	Control	9 meses	101	+++
			102	+++
			103	+++

			104	+++
--	--	--	-----	-----

(-) Ningún pólipo, (+) de 1 a 5 pólipos, (++) de 5 a 10, (+++) más de 10 pólipos

Podemos observar que la formación de pólipos está presente en todos los grupos en cualquier tiempo de muestreo, notándose un incremento en el tiempo 2 (7 meses) en los grupos que sólo recibieron inulina (Metlin o Sinergy1) después de la inducción y en el grupo control, el número de pólipos alcanza el mayor número, este grupo no recibió inulina en ningún momento a lo largo del estudio. En el tiempo 3 (9 meses) sucede lo mismo, los grupos que solo recibieron cualquiera de las dos inulinas después de la inducción, muestran un número elevado de pólipos, y el grupo control un número aún mayor.

**Cuadro N° 5. Resultados histopatología (H&E)**

	3 meses	7 meses	9 meses
1			
2			

3	<small>Se puede hacer el diagnóstico de los casos.</small>	<small>Se puede hacer el diagnóstico de los casos.</small>	<small>Se puede hacer el diagnóstico de los casos.</small>
4	<small>Se puede hacer el diagnóstico de los casos.</small>	<small>Se puede hacer el diagnóstico de los casos.</small>	<small>Se puede hacer el diagnóstico de los casos.</small>
5	<small>Se puede hacer el diagnóstico de los casos.</small>	<small>Se puede hacer el diagnóstico de los casos.</small>	<small>Se puede hacer el diagnóstico de los casos.</small>

6			
7			

*Grupo 1. Sinergy 1 pre-inducción; Grupo 2. Metlin pre-inducción; Grupo 3. Sinergy 1 pre y post inducción; Grupo 4. Metlin pre y post inducción; Grupo 5. Sinergy 1 post-inducción; Grupo 6. Metlin post-inducción; Grupo 7. Control. En todas las fotos se observa en menor o mayor grado, la formación de pólipos, la atrofia de vellosidades, la hiperplasia de tejido linfoide y del epitelio glandular, destacándose el grupo 7 (control) que tiene la mayor cantidad de pólipos y de las lesiones antes mencionadas y los grupos 3 (Sinergy pre y post inducción) y grupo 4 (Metlin pre y post inducción) poseen la menor cantidad de pólipos y de cambios patológicos en el intestino.*



## 7. Discusión

En este trabajo se intentó reproducir un modelo de colitis crónica asociada al desarrollo de cáncer de colon en ratones BALB/c empleando dos reactivos AOM y DSS. Sin embargo, no fue posible reproducir los hallazgos mencionados por Suzuki (2006), quien reporta que el modelo produce una colitis con el desarrollo de un 100% de pólipos y la proliferación subsecuente de células neoplásicas hasta desarrollar un adenocarcinoma a las 18-20 semanas.

Los cambios que pudieron observarse en el presente estudio fueron: atrofia de vellosidades, displasia en células intestinales e hiperplasia linfoide asociada a la mucosa intestinal con formación de pólipos. Estos coinciden con lo reportado por Suzuki y Perse (Suzuki, Kohno et al. 2006, Perse y Cerar 2012), quienes reportan que a las 18 semanas los cambios histológicos ya son evidentes y consisten en una infiltración leucocitaria mononuclear, desarreglo de la estructura de las criptas, linfocitosis profunda de la mucosa. Estas lesiones se presentaron en los tres tiempos de muestreo que obtuvimos a lo largo del estudio, sólo que conforme avanzó el tiempo, la severidad de las lesiones aumentó. Además, el número de pólipos en el grupo control es mucho más elevado en el tiempo 3 (9 meses) que en el resto de los grupos, corroborando así el mayor daño al no suplementar con cualquiera de las inulinas.

En otro estudio realizado por Perse y Cerar (2012) se hace énfasis en la importancia del peso molecular al utilizar DSS, reportando que un tratamiento de DSS de 40 kDa en ratones BALB/c provoca una inflamación de colon sumamente severa, ya que este agente penetra la membrana de la mucosa del intestino y a las 24 hrs ya se encuentran pequeñas cantidades de macrófagos en el intestino grueso, los linfonodos mesentéricos y en las células de Kupffer del hígado.

En el presente trabajo la primera toma de muestra se realizó a los 3 meses, donde ya no fue posible observar estos cambios, en el trabajo de Suzuki 2006 no realizan necropsias a diferentes tiempos, sólo al final del estudio y en nuestro trabajo se decidió estos tiempos dividiendo entre tres las 40 semanas restantes. Las manifestaciones clínicas al someter a los animales a este modelo fueron diarrea, pérdida de peso, impactación, deshidratación, piloerección, dolor abdominal, postración y la muerte en algunos casos, lo cual coincide con el trabajo de Perse y Cerar 2012. Sin embargo, estos signos inmediatos no aseguran las manifestaciones clínicas esperadas (como los cambios histológicos o la severidad de la inflamación) para un modelo crónico.

El rol que tiene la microflora intestinal deficiente en un proceso inflamatorio asociado a un desarrollo de cáncer, es sumamente importante, ya que el daño recurrente de la mucosa ayuda a la proliferación del epitelio colónico, provocando displasia (Hu, Elinav et al. 2013), la cual se observó sobre todo en el tiempo 3 (9 meses) del grupo control en nuestro trabajo. Si bien en este estudio no se determinó la microbiota intestinal, es bien sabido que esta tiene un efecto directo sobre la respuesta inflamatoria, así como sobre la respuesta inmune (Maslowskiy y Mackay 2011), puede modificarse para la prevención de enfermedades como la EII. La administración a lo largo de este estudio de prebióticos como la inulina pudo haber disminuido la displasia al favorecer un buen equilibrio de los microorganismos que la componen (Hu, Elinav et al. 2013, Delzenne, Neyrinck et al. 2013) sería importante determinar esto en el modelo murino de inflamación crónica en otro estudio.

Con respecto a la determinación de citocinas intestinales se encontró que, de acuerdo a lo esperado, los animales que no fueron tratados y que muestran los mayores daños provocados por el AOM y el DSS, tuvieron un aumento importante de  $TNF\alpha$ , una citocina que interviene en procesos tanto inflamatorios como neoplásicos. Estos hallazgos coinciden con lo reportado en otros estudios (Balkwill 2006, Wu y Zhou 2010, Zidi, Mestiri et al. 2010, Kim, Sung et al. 2014). Sin embargo, con respecto a IL-10 que es una citocina reguladora, observamos que los niveles también se encuentran elevados, lo cual no concuerda con lo reportado en los artículos citados anteriormente, donde se menciona que estos niveles disminuyen.

Ambos procesos, tanto el neoplásico como el inflamatorio, son sumamente dinámicos, por lo tanto, la dificultad para prever el comportamiento de estas citocinas aumenta al ser un modelo de inflamación crónica (Alex, Zachos et al. 2009). En nuestro estudio se reportó que la IL-10 y  $TNF\alpha$  se encontraban elevados en el grupo no tratado con inulinas, lo esperado sería que la IL-10 se encuentre disminuida ya que su comportamiento de manera normal es antagónico a  $TNF\alpha$ , según lo reportado por Rogler y Andus (1998), esto lo podemos justificar al momento de enfrentar el daño continuo y prolongado provocado directamente al epitelio intestinal por el DSS y al encontrar displasia en los enterocitos, signo de un proceso neoplásico en curso. La IL-10 puede mantenerse elevada al jugar un papel de tolerancia inmunológica (Alex, Zachos et al. 2009).

Erdman y Poutahidis (2010), reportaron en su trabajo el uso de ratones silvestres expuestos al mismo modelo empleado en este estudio (AOM-DSS), donde se incrementó la expresión de  $TNF\alpha$ , dando como resultado la formación de tumores colónicos. Propusieron el uso de citocinas

inmunoreguladoras como IL-10 como tratamiento para inhibir la sobreproducción de citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , y observaron que bajo condiciones proinflamatorias, estas moléculas fallaban en su rol inhibitorio y no contribuyeron a la inducción de la carcinogénesis (Terzic, Grivennikov et al. 2010, Zidi, Mestiri et al. 2010, Ullman y Itzkowitz 2011).

Terzic, Grivennikov et al. (2010), reportan cómo la IL-10 puede jugar un papel dañino o benéfico contra la tumorigénesis que va de acuerdo a las diferentes etapas de la enfermedad. Células T reguladoras, que son abundantes en el intestino y que liberan IL-10, suprimen la inflamación y la respuesta inmune antitumoral en algunos tipos de cáncer, mientras que en otros, pueden promover la progresión de un proceso neoplásico, como sucede en el caso de CACC, donde hay muchas células inflamatorias, incapaces de matar células cancerosas.

En los grupos que fueron tratados con inulinas (Synergy 1 o Metlin), ya sea en los grupos de pre-inducción, post-inducción o pre y post inducción, ambas citocinas TNF $\alpha$  e IL-10 presentaron niveles bajos con respecto al grupo control que no recibió ningún tipo de suplementación habiendo una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) como podemos observar en los cuadros N° 8, 11, 14, 17, 20 23, 26 29 del apartado de Anexos, evidenciando así una respuesta positiva a la suplementación con inulina en cualquiera de sus modalidades. En los mismos cuadros podemos comparar a las dos inulinas empleadas en este estudio y llegamos a la conclusión que entre ellas no existe una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), es decir su comportamiento es relativamente similar, esto implica que al administrar a nuestra dieta diaria cualquiera de los dos prebióticos, vamos a tener una disminución de TNF $\alpha$ , evitando así una inflamación que podría asociarse al desarrollo de cáncer de colon. Del mismo modo observamos de una manera clara, que ambas inulinas funcionan mucho mejor cuando se emplean en la dieta de manera rutinaria, antes de la inyección con AOM y la administración del DSS, es decir antes de desarrollar cambios histológicos provocados por una inflamación continua. Cuando existen lesiones marcadas en la mucosa colónica y los niveles de TNF $\alpha$  e IL-10 son elevados, el uso de la inulina ayuda a disminuirlos, pero lo hace de una manera ineficiente, por lo tanto el daño en la mucosa se sigue presentando y la inflamación, aunque en menor nivel, continúa.

La inulina es un prebiótico que al estimular el crecimiento de bacterias benéficas en el colon, modula una respuesta inmune adecuada para controlar los daños provocados por los agentes empleados en este modelo (Suzuki, Kohno et al. 2006). El TNF $\alpha$  se ha descrito como un promotor en la progresión del cáncer (Wu y Zhou 2010, Zidi, Mestiri et al. 2010, Kim, Sung et al. 2014), por lo

tanto al encontrar los valores de esta citocina en una baja cantidad, podríamos suponer un posible efecto preventivo contra cáncer de colon, aunque esto no pudo ser demostrado en este estudio.

## 8. Conclusión

Los resultados obtenidos no fueron los esperados, sin embargo, si fueron bastante útiles, ya que pudimos observar claramente cómo el uso de las inulinas ayuda a la prevención de la inflamación del colon, disminuyendo los niveles de TNF $\alpha$ .

El modelo empleado es sumamente largo, por lo tanto, la obtención de las muestras a diferentes tiempos nos da una visión global de lo que ocurrió durante todo el estudio, sin embargo, fue ambiguo y probablemente sea necesario reducir los tiempos de muestreo para poder trazar un patrón coherente del comportamiento de las citocinas en las diferentes fases de la inflamación y en el desencadenamiento de la neoplasia.

Con respecto a la comparación de las inulinas *Sinergy1* y *Metlin*, podemos decir que ambas previenen el desarrollo de cáncer la inflamación crónica del intestino, y lo hacen de una mejor manera al utilizarlas de manera cotidiana como suplementación en la dieta. Para tomar una decisión con respecto a qué inulina es la más adecuada, podemos inclinarnos a otros factores, como el económico, la disponibilidad, el sabor, etc.

\*\*Metlin y Sinergy 1 son marcas registradas

## 9. Bibliografía

Actis, G. C., et al. (2014). "Inflammatory bowel diseases: Current problems and future tasks." World J Gastrointest Pharmacol Ther **5(3)**: 169-174.

Alex, P., et al. (2009). "Distinct Cytokine Patterns Identified from Multiplex Profiles of Murine DSS and TNBS-induced Colitis." Inflamm Bowel Dis **15**: 341-352.

Andoh, A., et al. (2008). "Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **14(33)**: 5154-5161.

Bailón, E., et al. (2010). "Butyrate in vitro immune-modulatory effects might be mediated through a proliferation-related induction of apoptosis." Inmunobiology **9 (3)**: 183-184.

Balkwill, F. (2006). "TNF- $\alpha$  in promotion and progression of cancer." Cancer Metastasis Rev **25**: 409-416.

Bettelli, E., Korn, T., Kuchroo, V. K. (2007), "Th17: The third member of the effector T cell trilogy." Curr Opin Immunol. 19:652-7.

Bibbo, M., et al. (1990). "Adjacent to Human Colonic Adenocarcinoma Karyometric Marker Features in Normal-appearing Glands." Cancer Res **50**: 147-151.

Brady, L. J., et al. (2000). "The Role of Probiotic Cultures in the Prevention of Colon Cancer." J. Nutr. **130**: 410S-414S.

Cavaglieria, C. R., et al. (2003). "Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes." Life Sciences **73**: 1683-1690.

Correa, I., (2006). "Inmunidad innata gastrointestinal y enfermedad inflamatoria intestinal." GH continuada **5**: 5

Cross, M. L. (2002). "Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens." FEMS Immunology and Medical Microbiology **34**: 245-253.

Czerniak, B., et al. (1987). "Modification of H-ras oncogene p-21 expression and cell cycle progression in the human colon cancer cell line HT-29." Cancer Res **47**: 2826-2830.

Delzenne, N. M., et al. (2013). "Gut microbiota and metabolic disorders: how prebiotic can work?" British Journal of Nutrition **109**: S81-S85.

Erdman, S. and T. Poutahidis (2010). "Roles for inflammation and regulatory T cells in colon cancer." Toxicologic Pathol **38**: 76-87.

Greenwald, P., et al. (2001). "Diet and cancer prevention." European Journal of Cancer **37**: 948-965.

Heerdt, B. G., et al. (1994). "Differentiation and Apoptosis in Human Colonic Carcinoma Cell Potentiation by Specific Short-Chain

Fatty Acids of Lines." Cancer Res **54**: 3288-3294.

Hernández-Urzúa M. A., Alvarado-Navarro, A., "Interleucinas e inmunidad innata." (2001), Rev Biomed **12**:272-280

Hijová, E., et al. (2013). "Chemopreventive and metabolic effects of inulin in colon cancer development." JVS: 1-19.

Howe, G. R., et al. (1992). "Dietary intake of fiber and decrease risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies." JNCI **84**: 1887-1896.

Hu, B., et al. (2013). "Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer." PNAS **110 (31)**: 9862–9867.

Ishibashi, N., et al. (1997). "Bifidobacteria: their significance in human intestinal health." Mal J Nutr **3**: 149-159.

Ivanov, I.I., Zhou, L., Littman D.R. (2007). "Transcriptional regulation on Th17 cell differentiation." Semin Immunol. **19**: 409-17

Kim, D. H., et al. (2014). "Modulation of Colitis-associated Colon Tumorigenesis by Baicalein and Betaine." J Cancer Prev **19 (3)**: 153-160.

Klinder, A., et al. (2008). "Prebiotics and Reduction of Risk of Carcinogenesis: Review of Experimental and Human Data."

Leóna, A., et al. (2006). "Citocinas en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal." Med Clin **127 (4)**: 145-152.

Madrigal, L. and E. Sangronis (2007). "La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales." Archivos Latinoamericanos de Nutrición **57**: 387-396.

Martínez-Montiel, M. P. and M. T. Muñoz-Yagüe (2006). "Tratamientos biológicos en la enfermedad inflamatoria crónica intestinal." REV ESP ENFERM DIG **98 (4)** 265-291.

Maslowski, K. M. and C. R. Mackay (2011). "Diet, gut microbiota and immune responses." Nature immunology **12 (1)**: 1-5.

Matsuzaki, G., Umemura, M. (2007). "Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections." Microbiol Immunol **51**:1139-47

McIntyre, A., et al. (1993). "Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model." Gut **34**: 386-391.

Muniz, L. R., et al. (2012). "Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease." fimmu **3**: 1-13.

Ochoa-Carrillo F. J. (2013). "Los macrófagos, ángeles o demonios" GAMO **12 (1)**: 1-3.

Panga, G., et al. (2012). "How functional foods play critical roles in human health." Food Science and Human Wellness **2012**: 26-60.

Pérez-Conesa, D., et al. (2004). "Main prebiotics and their effects on human nutrition." AN. VET. (MURCIA) **20**: 5-20.

Pérez-Conesa, D., et al. (2004). "PREBIÓTICOS EN LA NUTRICIÓN HUMANA." AN. VET. (MURCIA) **20**: 5-20.

Perse, M. and A. Cerar (2012). "Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks." Journal of Biomedicine and Biotechnology **2012**: 1-14.

Philip, A., et al. (2009). "Distinct Cytokine Patterns Identified from Multiplex Profiles of Murine DSS and TNBS-induced Colitis." Inflamm Bowel Dis **15(3)**: 341-352.

Rebolé, A., et al. (2010). "Effects of inulin and enzyme complex, individually or in combination, on growth performance, intestinal microflora, cecal fermentation characteristics, and jejunal histomorphology in broiler chickens fed a wheat-and barley-based diet." Poult. Sci **89**: 276-286.

Rizzo, A., et al. (2011 ). "Intestinal inflammation and colorectal cancer: A double-edged sword?" World J Gastroenterol **17(26)**: 3092-3100.

Rogler, G. and T. Andus (1998). "Cytokines in Inflammatory Bowel Disease." World J. Surg **22**: 382-389.

Roller, M., et al. (2004). "Intestinal immunity of rats with azoxymethane-induced colon cancer is modulated by inulin enriched with oligofructose combined with Lactobacillus

rhamnosus and Bifidobacterium lactis." Br J Nutr. **92**: 931-938.

SAEMANN, M. D., et al. (2000). "Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production." FASEB J. **14**: 2380-2382.

Sarlos, P., et al. (2014 ). "Genetic update on inflammatory factors in ulcerative colitis: Review of the current literature." World J Gastrointest Pathophysiol **5(3)**: 304-321.

Schwartz, B. and Y. Hadar (2014). "Possible mechanisms of action of mushroom-derived glucans on inflammatory bowel disease and associated cancer." Ann Transl Med **2(2)**: 19.

Seifert, S. and B. Watzl (2007). "Inulin and Oligofructose: Review of Experimental Data on Immune Modulation." J. Nutr. **137**: 2563S-2567S.

Sepúlveda, S. E., et al. (2008). "Inflammatory bowel diseases: an immunological approach." Rev Méd Chile **136**: 367-375.

Serrano, A., (2009). "Células colaboradoras /TH1, TH2, TH17 y reguladoras (Treg, Th3, NKT en la artritis reumatoide." Reumatol Clin. **5(S1)**:1-5

Singh, B., et al. (1997). "C Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources." Carcinogenesis **18**: 1265-1270.



Songer, J. G. (1996). "Clostridial enteric disease of domestic animals." Clin Microbiol Rev **9**: 2116-2134.

Suzuki, R., et al. (2006). "Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice." Carcinogenesis **27**: 162-169.

Tanaka, T., et al. (2003). "A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate." Cancer Sci **94** 965-973.

Terzic, J., et al. (2010). "Inflammation and Colon Cancer." j.gastro **138 (6)**: 2101–2114.

Thomas A. 1995. Hematoxilina y Eosina. Métodos Histotecnológicos. Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) y el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). pp. 55-58.

Turusov, V. S., et al. (1988). "Carcinogenicity of Deuterium-labeled 1,2-Dimethylhydrazine in Mice." Cancer Res **48**: 2162-2167.

Ullman, T. A. and S. H. Itzkowitz (2011). "Intestinal Inflammation and Cancer." j.gastro **140**: 1807-1816.

Uronis, J. M. and D. W. Threadgill (2009). "Murine models of colorectal cancer." Mamm Genome **20**: 261-268.

V. P. Gourineni, M. V., J. Boateng, L. Shackelford, and K. NBhat (2011). "Chemopreventive Potential of Synergy1 and Soybean in Reducing Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci in Fisher 344 Male Rats." Journal of Nutrition and Metabolism **2011**: 1-8.

V. P. Gourineni, M. V., J. Boateng, L. Shackelford, K. NBhat (2011). "Chemopreventive Potential of Synergy1 and Soybean in Reducing Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci in Fisher 344 Male Rats." Journal of Nutrition and Metabolism **2011**: 1-8.

Wu, Y. and B. Zhou (2010). "TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion." bjcancer **102** 639 - 644.

Zhiqin, W., et al. (2014). "Inflammatory Bowel Disease-related Colorectal Cancer in the Asia-Pacific Region: Past, Present, and Future." Intest Res **12(3)**: 194-204.

Zidi, I., et al. (2010). "TNF- $\alpha$  and its inhibitors in cancer." Med Oncol (**)** : **27**: 185-198.

10. Anexos

Cuadro N° 6

*Se observa que a pesar de encontrar estadísticamente las diferencias significativas, principalmente con los grupos suplementados con Sinergy1, éstas en realidad no varían mucho de la media general. Por lo tanto podemos concluir que a pesar de haber diferencias estadísticas entre los grupos, no es relevante fisiológicamente hablando.*

Cuadro N° 7

**Análisis de verosimilitud para TNF $\alpha$  (pg/mL)**

**lavado de colon**

Origen	Tipo III		
	Razón de verosimilitudes	Grados de libertad	p
(Intersección)	96.29	.999	.001
MUESTRA	5.04	.999	.025
GRUPO	92.98	6	.001
MUESTRA * GRUPO	6.06	6	.416

Variable dependiente: TNFA

Modelo: (Intersección), MUESTRA, GRUPO, MUESTRA \* GRUPO

En este cuadro se observa que los efectos de muestra y grupo fueron significativos ( $P=0.001$ ), mientras que la interacción no ( $P=0.416$ ), esto quiere decir que los cambios entre los muestreos fueron similares en algunos grupos.

**Cuadro N°8**  
**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$  (pg/mL)**  
**lavado de colon por grupo**

GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
SINERGY PRE-INDUCCIÓN	135.301	61.888	14.002	256.600
METLIN PRE-INDUCCIÓN	232.647	79.897	76.051	389.243
SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	255.223	58.712	140.149	370.297
METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	96.683	66.847	0	227.701
SINERGY POST-INDUCCIÓN	339.902	66.847	208.884	470.920
METLIN POST-INDUCCIÓN	487.457	55.354	378.963	595.950
CONTROL	1213.066	58.712	1097.991	1328.140

En este cuadro podemos observar que el grupo con los niveles más bajos de TNF $\alpha$  fue el de prevención y tratamiento con Metlin (96.683 pg/mL) seguidos por el grupo de prevención con Sinergy (135.301 pg/mL). El valor más alto de TNF $\alpha$  fue el grupo control (1213.066 pg/mL).

**Cuadro N°9**

**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$  (pg/mL) lavado de colon por muestra\*grupo  
 (tomando en cuenta muestreo 2 y 3)**

MUESTRA	GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
				Inferior	Superior
TIEMPO 2	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	155.207	87.5234775	0	326.750
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	158.980	101.0634066	0	357.060
	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	115.605	87.5234775	0	287.147
	METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	123.366	101.0634066	0	321.447
	SINERGY POST-INDUCCIÓN	312.262	87.5234775	140.719636	483.805
	METLIN POST-INDUCCIÓN	383.628	78.2833781	230.195398	537.060
TIEMPO 3	CONTROL	1119.210	78.2833781	965.777398	1272.642
	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	115.395	87.523		286.937
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	306.315	123.776	63.716	548.913
	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	394.842	78.283	241.409	548.274
	METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	70.000	87.523	0	241.542
	SINERGY POST-INDUCCIÓN	367.543	101.063	169.462	565.623
	METLIN POST-INDUCCIÓN	591.286	78.283	437.853	744.718
	CONTROL	1306.922	87.523	1135.379	1478.465

**Cuadro N°10**

**Análisis de verosimilitud para TNF $\alpha$  (pg/mL) de colon**

Origen	Tipo III		
	Razón de verosimilitudes	Grados de libertad	p
(Intersección)	87.442	.999	.001
MUESTRA	.400	.999	.527
GRUPO	63.890	6	.001
MUESTRA * GRUPO	5.124	6	.528

Variable dependiente: TNFA

Modelo: (Intersección), MUESTRA, GRUPO, MUESTRA \* GRUPO

*Se puede observar una diferencia significativa ( $p=0.001$ ) en los grupos, mientras que el efecto en los tiempos de muestreo o la intersección de ambos no, por lo tanto podemos decir que de un grupo al otro hay cambios, pero no entre los tiempos de muestreo 2 y el 3.*

**Cuadro N° 11**

**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$  (pg/mL)**

**de colon por grupo**

GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
SINERGY PRE-INDUCCIÓN	248.985	72.654	106.584	391.385
METLIN PRE-INDUCCIÓN	219.974	93.796	36.135	403.812
SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	247.065	68.926	111.971	382.158

METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	218.019	78.476	64.208	371.829
SINERGY POST-INDUCCIÓN	452.732	78.476	298.922	606.543
METLIN POST-INDUCCIÓN	445.041	64.984	317.673	572.408
CONTROL	1102.802	68.926	967.709	1237.896

*En este cuadro podemos observar que el grupo con los niveles más bajos de TNF $\alpha$  fue el de prevención y tratamiento con Metlin (218.019 pg/mL) seguidos por el grupo de prevención con Metlin (219.974 pg/mL). El valor más alto de TNF $\alpha$  fue el grupo control (1102.802 pg/mL).*

**Cuadro N°12**

**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$  (pg/mL) de colon por muestra\*grupo (tomando en cuenta muestreo 2 y 3)**

MUESTRA	GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
				Inferior	Superior
TIEMPO 2	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	346.130	102.749	144.744	547.515
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	167.053	118.644	0	399.592
	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	186.130	102.749	0	387.515
	METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	204.593	118.644	0	437.132
	SINERGY POST-INDUCCIÓN	573.182	102.749	371.797	774.567
	METLIN POST-INDUCCIÓN	432.062	91.901	251.937	612.186
	CONTROL	1152.368	91.901	972.243	1332.492
TIEMPO 3	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	151.840	102.749	0	353.225

METLIN PRE-INDUCCIÓN	272.895	145.309	0	557.696
SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	308.000	91.901	127.875	488.124
METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	231.445	102.749	30.059	432.830
SINERGY POST-INDUCCIÓN	332.283	118.644	99.743	564.822
METLIN POST-INDUCCIÓN	458.020	91.901	277.895	638.144
CONTROL	1053.237	102.749	851.852	1254.622

**Cuadro N° 13**

**Análisis de verosimilitud para TNF $\alpha$  (pg/mL)**

**lavado de yeyuno**

Origen	Tipo III		
	Razón de verosimilitudes	Grados de libertad	p
(Intersección)	106.175	.999	.001
MUESTRA	1.027	.999	.311
GRUPO	81.811	6	.001
MUESTRA * GRUPO	30.478	6	.001

Variable dependiente: TNFA

Modelo: (Intersección), MUESTRA, GRUPO, MUESTRA \* GRUPO

*Se puede observar una diferencia significativa ( $p=0.001$ ) en los grupos, así como en la intersección mientras que el efecto en los tiempos de muestreo no ( $p=0.311$ ), así se puede decir que cada uno de los grupos va a responder de diferente manera por los tratamientos aplicados, sin embargo debido a que la intersección también muestra diferencia significativa ( $p=0.001$ ) podemos concluir que estos cambios varían, es decir algunos incrementan, mientras que otros disminuyen.*

Cuadro N° 14

Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$  (pg/mL) lavado de yeyuno por grupo

GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
SINERGY PRE-INDUCCIÓN	341.212	60.354	222.920	459.504
METLIN PRE-INDUCCIÓN	333.919	77.916	181.204	486.633
SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	203.447	57.257	91.225	315.669
METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	195.105	65.189	67.335	322.875
SINERGY POST-INDUCCIÓN	373.980	65.189	246.210	501.750
METLIN POST-INDUCCIÓN	403.410	53.982	297.606	509.213
CONTROL	1144.304	57.257	1032.082	1256.525

*Podemos observar que el grupo con los niveles más bajos de TNF $\alpha$  fue el de prevención y tratamiento con Metlin (195.105 pg/mL) seguidos por el grupo de prevención y tratamiento con Sinergy (203.447 pg/mL). El valor más alto de TNF $\alpha$  fue el grupo control una vez más (1144.304 pg/mL).*



**Cuadro N°15**

**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$  (pg/mL) lavado de yeyuno por muestra\*grupo (tomando en cuenta muestreo 2 y 3)**

MUESTRA	GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
				Inferior	Superior
TIEMPO 2	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	581.392	85.353	414.102	748.682
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	336.523	98.557	143.353	529.693
	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	268.895	85.353	101.604	436.185
	METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	194.946	98.557	1.776	388.116
	SINERGY POST-INDUCCIÓN	251.997	85.353	84.707	419.287
	METLIN POST-INDUCCIÓN	281.326	76.342	131.697	430.954
	CONTROL	910.896	76.342	761.267	1060.524
TIEMPO 3	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	101.032	85.353	0	268.322
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	331.315	120.708	94.730	567.899
	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	138.000	76.342	0	287.628
	METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	195.265	85.353	27.974	362.555
	SINERGY POST-INDUCCIÓN	495.963	98.557	302.793	689.133
	METLIN POST-INDUCCIÓN	525.494	76.342	375.865	675.122
	CONTROL	1377.712	85.353	1210.422	1545.002

**Cuadro N° 16**

**Análisis de verosimilitud para TNF $\alpha$  (pg/mL) para yeyuno**

Origen	Tipo III		
	Razón de verosimilitudes	Grados de libertad	P
(Intersección)	90.919	.999	.001
MUESTRA	.495	.999	.482
GRUPO	79.325	6	.001
MUESTRA * GRUPO	8.590	6	.198

Variable dependiente: TNFA

Modelo: (Intersección), MUESTRA, GRUPO, MUESTRA \* GRUPO

*Se puede observar una diferencia significativa ( $p=0.001$ ) en los grupos, pero no se encuentran diferencias significativas en el efecto muestra ( $p=0.482$ ) y en la intersección ( $P=0.198$ ).*

**Cuadro N° 17**

**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNF $\alpha$  (pg/mL) para yeyuno por grupo**

GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
SINERGY PRE-INDUCCIÓN	139.051	60.229	21.002	257.099
METLIN PRE-INDUCCIÓN	158.439	77.756	6.039	310.838
SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	210.737	57.139	98.746	322.727
METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	143.393	65.055	15.887	270.900

SINERGY POST-INDUCCIÓN	413.696	65.055	286.189	541.203
METLIN POST-INDUCCIÓN	432.621	53.871	327.035	538.206
CONTROL	1032.591	57.139	920.601	1144.582

*Podemos observar que el grupo con los niveles más bajos de TNFα fue el de prevención con Sinergy (139.052 pg/mL) seguidos por el grupo de prevención y tratamiento con Metlin (143.393 pg/mL). El valor más alto de TNFα para la muestra obtenida del yeyuno fue el grupo control (1032.591 pg/mL).*

**Cuadro N° 18**

**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de TNFα (pg/mL) para yeyuno por muestra\*grupo (tomando en cuenta muestreo 2 y 3)**

MUESTRA	GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
				Inferior	Superior
TIEMPO 2	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	154.287	85.177	0	321.232
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	214.243	98.354	21.471	407.015
	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	137.052	85.177	0	303.997
	METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	232.840	98.354	40.068	425.611
	SINERGY POST-INDUCCIÓN	346.870	85.177	179.924	513.815
	METLIN POST-INDUCCIÓN	426.168	76.185	276.847	575.488
	CONTROL	901.946	76.185	752.625	1051.266
TIEMPO 3	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	123.815	85.177	0	290.760
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	102.635	120.459	0	338.731
	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	284.422	76.185	135.101	433.742

METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	53.947	85.177	0	220.892
SINERGY POST-INDUCCIÓN	480.523	98.354	287.751	673.295
METLIN POST-INDUCCIÓN	439.074	76.185	289.753	588.394
CONTROL	1163.237	85.177	996.292	1330.182

IL-10

**Cuadro N°19**

**Análisis de verosimilitud para IL-10 (pg/mL) lavado colon**

Origen	Tipo III		
	Razón de verosimilitudes	Grados de libertad	p
(Intersección)	76.591	.999	.001
MUESTRA	2.461	.999	.117
GRUPO	68.467	6	.001
MUESTRA * GRUPO	6.660	6	.353

Variable dependiente: IL10

Modelo: (Intersección), MUESTRA, GRUPO, MUESTRA \* GRUPO

Se puede observar una diferencia significativa ( $p=0.001$ ) en los grupos, pero no se encuentran diferencias significativas en el efecto muestra ( $p=0.117$ ) y en la intersección ( $P=0.353$ ).

**Cuadro N° 20**

**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 (pg/mL) para lavado de colon por grupo**

GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
SINERGY PRE-INDUCCIÓN	287.406	128.373	35.798	539.013
METLIN PRE-INDUCCIÓN	371.892	165.729	47.068	696.716
SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	247.607	121.785	8.9116	486.303
METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	304.643	138.659	32.876	576.410

SINERGY POST-INDUCCIÓN	648.485	138.659	376.718	920.253
METLIN POST-INDUCCIÓN	793.065	114.820	568.020	1018.109
CONTROL	1911.874	121.785	1673.178	2150.570

*Se puede observar que el grupo con los niveles más bajos de IL-10 fue el de prevención y tratamiento con Sinergy (247.607 pg/mL) seguidos por el grupo de prevención con Sinergy (287.406 pg/mL). El valor más alto de IL-10 para la muestra obtenida del lavado de colon fue el grupo control (1911.874 pg/mL).*

**Cuadro N° 21**

**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 (pg/mL) para lavado de colon por muestra\*grupo (tomando en cuenta muestreo 2 y 3)**

MUESTRA	GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
				Inferior	Superior
TIEMPO 2	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	313.700	181.547	0	669.526
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	299.900	209.633	0	710.773
	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	252.325	181.547	0	608.151
	METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	409.566	209.633	0	820.440
	SINERGY POST-INDUCCIÓN	1053.265	181.547	697.438	1409.091
	METLIN POST-INDUCCIÓN	845.068	162.381	526.806	1163.329
	CONTROL	1952.556	162.381	1634.294	2270.817
TIEMPO 3	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	261.112	181.547	0	616.939
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	443.885	256.747	0	947.100
	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	242.890	162.381	0	561.151

METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	199.720	181.547	0	555.546
SINERGY POST-INDUCCIÓN	243.706	209.633	0	654.580
METLIN POST-INDUCCIÓN	741.062	162.381	422.800	1059.323
CONTROL	1871.192	181.547	1515.365	2227.019

**Cuadro N° 22**

**Análisis de verosimilitud para IL-10 (pg/mL) colon**

Origen	Tipo III		
	Razón de verosimilitudes	Grados de libertad	p
(Intersección)	95.885	.999	.001
MUESTRA	10.891	.999	.001
GRUPO	74.438	6	.001
MUESTRA * GRUPO	6.166	6	.405

Variable dependiente: IL10

Modelo: (Intersección), MUESTRA, GRUPO, MUESTRA \* GRUPO

*Se puede observar una diferencia significativa ( $p=0.001$ ) en los grupos y en la muestra, pero no se encuentran diferencias en la intersección ( $p=0.405$ ), por lo tanto, cada uno de los grupos presentó cambios con respecto al resto de los grupos y en cada uno de los muestreos.*

**Cuadro N°23**

**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 (pg/mL) de colon por grupo**

GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
SINERGY PRE-INDUCCIÓN	293.116	114.913	67.889	518.342
METLIN PRE-INDUCCIÓN	363.200	148.352	72.434	653.965
SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	420.667	109.016	206.999	634.335
METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	535.606	124.120	292.334	778.878
SINERGY POST-INDUCCIÓN	672.389	124.120	429.116	915.661
METLIN POST-INDUCCIÓN	863.808	102.781	662.359	1065.256
CONTROL	1953.585	109.016	1739.916	2167.253

*En el cuadro 19 se puede observar que el grupo con los niveles más bajos de IL-10 fue el de prevención con Sinergy (293.116 pg/mL) seguidos por el grupo de prevención con Metlin (363.200 pg/mL). El valor más alto de IL-10 fue el grupo control (1953.585 pg/mL).*

**Cuadro N° 24**

**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 (pg/mL) de colon por muestra\*grupo (tomando en cuenta muestreo 2 y 3)**

MUESTRA	GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
				Inferior	Superior
TIEMPO 2	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	432.900	162.512	114.381	751.418
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	321.400	187.652	0	689.193



	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	656.225	162.512	337.706	974.743
	METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	875.100	187.652	507.306	1242.893
	SINERGY POST-INDUCCIÓN	909.965	162.512	591.446	1228.483
	METLIN POST-INDUCCIÓN	890.556	145.355	605.664	1175.447
	CONTROL	2115.668	145.355	1830.776	2400.559
	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	153.332	162.512	0	471.850
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	405.000	229.826	0	855.452
	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	185.110	145.355	0	470.001
TIEMPO 3	METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	196.112	162.512	0	514.630
	SINERGY POST-INDUCCIÓN	434.813	187.652	67.020	802.606
	METLIN POST-INDUCCIÓN	837.060	145.355	552.168	1121.951
	CONTROL	1791.502	162.512	1472.984	2110.020

Cuadro N° 25

**Análisis de verosimilitud para IL-10 (pg/mL) lavado yeyuno**

Origen	Tipo III		
	Razón de verosimilitudes	Grados de libertad	p
(Intersección)	81.386	.999	.001
MUESTRA	8.380	.999	.004
GRUPO	50.544	6	.001
MUESTRA * GRUPO	3.081	6	.799

Variable dependiente: IL10

Modelo: (Intersección), MUESTRA, GRUPO, MUESTRA \* GRUPO

*Se puede observar una diferencia significativa ( $p=0.001$ ) en los grupos y en la muestra, pero no se encuentran diferencias en la intersección ( $p=0.405$ ).*

Cuadro N° 26

**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 (pg/mL) lavado yeyuno por grupo**

GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
SINERGY PRE-INDUCCIÓN	485.062	138.532	213.543	756.581
METLIN PRE-INDUCCIÓN	577.178	178.844	226.649	927.707
SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	465.667	131.423	208.081	723.252
METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	570.238	149.632	276.964	863.512
SINERGY POST-INDUCCIÓN	607.239	149.632	313.965	900.513
METLIN POST-INDUCCIÓN	654.809	123.907	411.955	897.662
CONTROL	1856.027	131.423	1598.442	2113.612

*Se puede observar que el grupo con los niveles más bajos de IL-10 fue el de prevención Y tratamiento con Sinergy (465.667 pg/mL) seguidos por el grupo de prevención con Sinergy (485.062 pg/mL). El valor más alto de IL-10 fue el grupo control (1856.027 pg/mL).*

**Cuadro N° 27**

**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 (pg/mL) de lavado de yeyuno por muestra\*grupo (tomando en cuenta muestreo 2 y 3)**

MUESTRA	GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
				Inferior	Superior
TIEMPO 2	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	775.125	195.914	391.139	1159.110
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	575.466	226.222	132.078	1018.854
	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	724.000	195.914	340.014	1107.985
	METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	764.366	226.222	320.978	1207.754
	SINERGY POST-INDUCCIÓN	800.772	195.914	416.787	1184.757
	METLIN POST-INDUCCIÓN	830.548	175.231	487.100	1173.995
	CONTROL	1895.000	175.231	1551.552	2238.447
TIEMPO 3	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	195.000	195.914	0	578.985
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	578.890	277.065	35.852	1121.927
	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	207.334	175.231	0	550.781
	METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	376.110	195.914	0	760.095
	SINERGY POST-INDUCCIÓN	413.706	226.222	0	857.094
	METLIN POST-INDUCCIÓN	479.070	175.231	135.622	822.517
	CONTROL	1817.055	195.914	1433.069	2201.040

**Cuadro N° 28**

**Análisis de verosimilitud para IL-10 (pg/mL) yeyuno**

Origen	Tipo III		
	Razón de verosimilitudes	Grados de libertad	p
(Intersección)	75.968	.999	.001
MUESTRA	5.277	.999	.022
GRUPO	65.579	6	.001
MUESTRA * GRUPO	2.966	6	.813

Variable dependiente: IL10

Modelo: (Intersección), MUESTRA, GRUPO, MUESTRA \* GRUPO

*Se puede observar una diferencia significativa ( $p=0.001$ ) en los grupos y en la muestra, pero no se encuentran diferencias en la intersección ( $p=0.405$ ).*

**Cuadro N° 29**

**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 (pg/mL) yeyuno por grupo**

GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
SINERGY PRE-INDUCCIÓN	374.785	137.755	104.790	644.779
METLIN PRE-INDUCCIÓN	422.260	177.840	73.698	770.822
SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	401.287	130.685	145.147	657.427
METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	520.560	148.792	228.932	812.188
SINERGY POST-INDUCCIÓN	466.230	148.792	174.603	757.858
METLIN POST-INDUCCIÓN	612.473	123.211	370.982	853.963
CONTROL	2064.111	130.685	1807.971	2320.251

*Se puede observar que el grupo con los niveles más bajos de IL-10 fue el de prevención con Sinergy (374.785 pg/mL) seguidos por el grupo de prevención y tratamiento con Sinergy (401.287 pg/mL). El valor más alto de IL-10 fue el grupo control (2064.111 pg/mL).*

**Cuadro n° 30**

**Medias marginales, errores estándar e intervalos de confianza de IL-10 (pg/mL) de yeyuno por muestra\*grupo  
 (tomando en cuenta muestreo 2 y 3)**

MUESTRA	GRUPO	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
				Inferior	Superior
TIEMPO 2	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	362.625	194.815	0	744.455
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	443.966	224.952	3.066	884.866
	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	504.575	194.815	122.744	886.405
	METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	684.733	224.952	243.833	1125.633
	SINERGY POST-INDUCCIÓN	774.685	194.815	392.854	1156.515
	METLIN POST-INDUCCIÓN	757.878	174.247	416.358	1099.397
	CONTROL	2226.998	174.247	1885.478	2568.517
TIEMPO 3	SINERGY PRE-INDUCCIÓN	386.945	194.815	5.114	768.775
	METLIN PRE-INDUCCIÓN	400.555	275.510	0	940.544
	SINERGY PRE Y POST-INDUCCIÓN	298.000	174.247	0	639.519
	METLIN PRE Y POST-INDUCCIÓN	356.387	194.815	0	738.217
	SINERGY POST-INDUCCIÓN	157.776	224.952	0	598.676
	METLIN POST-INDUCCIÓN	467.068	174.247	125.548	808.587
	CONTROL	1901.225	194.815	1519.394	2283.055