

Efecto sobre los marcadores nutricios de un modelo de focos de criptas aberrantes inducidos por azoximetano y dextrano de sulfato sódico en ratas Sprague Dawley

Alejandra González Reyes

2019



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Efecto sobre los marcadores nutricios de un modelo de focos de criptas aberrantes inducidos por azoximetano y dextrano de sulfato sódico en ratas Sprague Dawley

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Nutrición

Presenta:

Alejandra González Reyes

Dirigida por:

Dr. Jorge Luis Chávez Servín



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Efecto sobre los marcadores nutricios de un modelo  
de focos de criptas aberrantes inducidos por  
azoximetano y dextrano de sulfato sódico en ratas  
Sprague Dawley

**por**

Alejandra González Reyes

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** CNLIN-237990



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Nutrición

"Efecto sobre los marcadores nutricios de un modelo de focos de criptas aberrantes inducidos por azoximetano y dextrano de sulfato sódico en ratas Sprague Dawley"

Opción de titulación  
**Tesis Individual**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Licenciado en Nutrición

**Presenta:**  
Alejandra González Reyes

**Dirigido por:**  
Dr. Jorge Luis Chávez Servín

SINODALES

Dr. Jorge Luis Chávez Servín  
Presidente

MNH. Aarón Kuri García  
Secretario

Dr. Roberto Augusto Ferríz Martínez  
Vocal

Dr. Margarita de Jesús Teresa García Gasca  
Suplente

M. en C. Francisco Luján Méndez  
Suplente

Dra. Juana Elizabeth Elton Puente  
Directora de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Gro.  
Mayo, 2019  
México

## RESUMEN

**Introducción:** Para valorar posibles alternativas de quimioprevención es necesario un conocimiento puntual de la progresión tumoral colorrectal sobre marcadores nutricios. Debido a las dificultades intrínsecas para realizar estudios en humanos, el estudio en un modelo roedor es pertinente. **Objetivo:** Evaluar el efecto sobre marcadores nutricios tras la inducción química de modelo de focos de criptas aberrantes por AOM/DSS a tiempo subcrónico y crónico en un modelo *in vivo*. **Materiales y Métodos:** Estudio experimental, comparativo y longitudinal. Se utilizaron 24 ratas macho Sprague Dawley de 4 semanas de edad, con administración de alimento y agua potable *ad libitum*, se ajustó el ciclo circadiano a 12/12 horas, temperatura regulada ( $23 \pm 1^\circ \text{C}$ ). Con una semana de adaptación, se formaron 2 grupos (n= 12) Se pesó a los animales 1 vez por semana, y se registró la cantidad de alimento y bebida consumido 5 veces por semana, respectivamente. El grupo AOM/DSS fue administrado con AOM (10 mg/kg) vía intraperitoneal a la 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> semana del experimento seguido de una semana de administración DSS al 2% en el agua para beber. Al grupo control se le administró solución salina vía intraperitoneal. Se realizaron 2 sacrificios mediante decapitación, en la semana 16 y 32 en los que se pesó hígado, corazón, páncreas, timo, riñones, intestino delgado y colon, que también fue medido en longitud. Posteriormente se realizaron químicas sanguíneas, biometrías hemáticas, análisis morfológicos del colon e histopatologías de órganos blancos. Se utilizó una prueba *T de Student* no pareada para determinar las diferencias entre grupos, utilizando una significancia estadística  $p < 0.05$ . **Resultados:** Se confirmaron lesiones pre-neoplásicas con la presencia de focos de criptas aberrantes, en la etapa subcrónica se observaron cambios entre grupos en el peso del hígado y colon, y en el conteo de linfocitos. En ambas etapas se observaron daños histopatológicos en hígado, riñón y colon, así como alteraciones en los niveles de glucosa sérica. **Conclusiones:** El modelo para focos de criptas aberrantes propuesto puede ser utilizado en etapa sub-crónica sin necesidad de llevarlo a tiempo crónico. Es necesaria más investigación para determinar el mecanismo de los efectos observados.

(Palabras clave: focos de criptas aberrantes, AOM/DSS, nutrición)

## SUMMARY

**Introduction:** To evaluate possible chemoprevention alternatives, a precise knowledge of the colorectal tumor progression on nutritional markers is necessary. Due to the intrinsic difficulties in conducting studies in humans, the study in a rodent model is relevant. **Objective:** To evaluate the effect on nutritional markers after the chemical induction of aberrant crypt foci model by AOM / DSS at subchronic and chronic time in an in vivo model. **Materials and Methods:** Experimental, comparative and longitudinal study. Twenty four four-week-old Sprague Dawley male rats with feed administration and drinking water ad libitum were used. The circadian cycle was adjusted to 12/12 hours, regulated temperature ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ). With one week of adaptation, 2 groups were formed ( $n = 12$ ). The animals were weighed once a week, and the amount of food and drink consumed 5 times per week, respectively, was recorded. The AOM / DSS group was administered with AOM (10 mg/kg) intraperitoneally at the 2nd and 3rd week of the experiment followed by one week of 2% DSS administration in the drinking water. The control group was administered intraperitoneal saline solution. Two sacrifices were performed by decapitation, at week 16 and 32, in which the liver, heart, pancreas, thymus, kidneys, small intestine and colon were weighed, which was also measured in length. Subsequently, blood chemistries, blood biometrics, morphological analysis of the colon and histopathologies of white organs were performed. A non-paired *Student's T test* was used to determine the differences between groups, using a statistical significance  $p < 0.05$ . **Results:** Pre-neoplastic lesions were confirmed with the presence of aberrant crypt foci, in the subchronic stage changes were observed between groups in liver and colon weight, and in lymphocyte count. In both stages, histopathological damage was observed in liver, kidney and colon, as well as alterations in serum glucose levels. **Conclusions:** The model for proposed aberrant crypt foci can be used in the sub-chronic stage without the need to use a chronic time. More research is needed to determine the mechanism of the observed effects.

(**Keywords:** aberrant crypt foci, AOM / DSS, nutrition)

A la Universidad Autónoma de Querétaro.

## DEDICATORIAS

A toda mi familia, especialmente a mis papás, Adela y Raúl por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser la mujer que soy hoy y que gracias a ustedes estoy cumpliendo mis sueños, pero más que nada, por su amor.

A mis hermanas Vicky y Claudia por ser ejemplos a seguir y a Tomás Guzmán por inculcarme el amor por la ciencia y el progreso. A mi madrina Angélica por los innumerables consejos y palabras apoyo. A mis abuelitos, Virginia y Pedro por su amor y compañía.

A las personas que se convirtieron en parte de la familia que construyes en la universidad, que mostraron su apoyo y me impulsaron a seguir adelante Diana, Evelyn, Daniela, Elizabeth, Karine, Rodrigo, Héctor.

A cada uno de ustedes con mucho cariño, dedico este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco los financiamientos y apoyos recibidos por el Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). A mi director de tesis Dr. Jorge Luis Chávez Servín y a mi asesor MNH. Aarón Kuri García por la orientación y apoyo que siempre me brindaron, lo que me permitió crecer como profesionista y como persona. Al equipo de trabajo del Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Naturales. También a todos los alumnos de diferentes instituciones que apoyaron nuestro proyecto con el beneficio de una beca o sin ella, con especial mención a Iván Terrazas Cruz. Y en particular a la Dirección de Servicios Escolares y la Dirección de Investigación y Posgrado.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	i
SUMMARY .....	ii
DEDICATORIAS .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
ÍNDICE .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	2
2.1. Cáncer .....	2
2.2. Etapas del proceso cancerígeno .....	2
2.2.1. Iniciación .....	3
2.2.2. Promoción .....	3
2.2.3. Progresión .....	3
2.3. Cáncer colorectal y FCA .....	4
2.4 Modelos subcrónicos y crónicos .....	5
2.5. Modelos biológicos de CCR .....	5
2.6. Importancia de los modelos animales en estudio del cáncer en humanos ...	7
2.7. Observaciones en el estado nutricio en modelos murinos de inducción de neoplasmas de colon .....	7
2.8. Relación del cáncer con el sistema inmune .....	8

III. JUSTIFICACIÓN .....	9
IV. OBJETIVO GENERAL .....	9
4.1. Objetivos específicos .....	10
V. Hipótesis .....	10
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
6.1. Aprobación bioética: .....	10
6.2 Tipo de estudio y modelo animal .....	10
6.3. Inducción de FCA .....	11
6.4. Peso de órganos.....	11
6.5. Análisis de muestras.....	12
6.6 Química sanguínea y biometría hemática.....	12
6.7. Cuantificación de FCA .....	12
6.8 Análisis histopatológico.....	13
6.9. Análisis estadístico .....	13
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	13
7.1. Registro de peso corporal, consumo de alimento y agua. ....	13
7.2. Peso de órganos.....	17
7.3. Cuantificación de focos de criptas aberrantes .....	18
7.4. Biometrías hemáticas .....	21
7.5. Químicas sanguíneas. ....	23
7.6. Análisis histopatológico.....	25
VIII. CONCLUSIONES .....	29
IX. LITERATURA CITADA.....	30

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Cambios en el peso corporal (subcrónico)	14
Tabla 2. Cambios en el peso corporal (crónico)	14
Tabla 3. Comparación del peso de los órganos en unidades arbitrarias ajustadas al final del estudio.	17
Tabla 4. Biometría hemática subcrónico a grupo Control y AOM/DSS.	21
Tabla 5. Biometría hemática crónico a grupo Control y AOM/DSS.	22
Tabla 6. Química sanguínea subcrónico a grupo Control y AOM/DSS.	23
Tabla 7. Química sanguínea crónico a grupo Control y AOM/DSS.	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Consumo de alimento (subcrónico)	14
Figura 2. Consumo de agua (subcrónico)	15
Figura 3. Consumo de alimento (crónico)	15
Figura 4. Consumo de agua (crónico)	16
Figura 5. FCA por número de criptas (subcrónico)	18
Figura 6. FCA por número de criptas (crónico)	19
Figura 7. Imágenes representativas de FCA de a) 1 cripta, b) 2 criptas, c) 3 criptas y d) 4 criptas o más, presentes en la mucosa colónica de las ratas AOM/DSS.	19
Figura 8. Comparación del número de FCA en el grupo AOM/DSS subcrónico y crónico.	20
Figura 9. Subcrónico. Fotografías tomadas en microscopio de secciones de hígado, riñón y colon transversal, teñidos con hematoxilina y eosina.	26
Figura 10. Crónico. Fotografías tomadas en microscopio de secciones de hígado, riñón y colon transversal, teñidos con hematoxilina y eosina.	27

## INTRODUCCIÓN

De los tipos de cáncer que existen, el cáncer colorectal (CCR) ocupa el 3er lugar en mortalidad a nivel mundial y nacional. Los focos de criptas aberrantes (FCA) son lesiones preneoplásicas en colon que pueden ser utilizados como herramienta para estudiar procesos preventivos para el CCR. Por las dificultades intrínsecas para trabajar en humanos, el estudio en un modelo animal es necesario para estudiar la iniciación inducida por azoximetano (AOM) y promovida por dextrano sulfato sódico (DSS) simulando una carcinogénesis colónica humana. No existe información de los efectos sobre marcadores nutricios para este proceso. El objetivo del estudio es evaluar el efecto de la inducción química focos de criptas aberrantes (FCA) por azoximetano (AOM) y dextrano de sulfato sódico (DSS) en marcadores nutricios (antropométricos, químicas sanguíneas de 18 elementos y biometrías hemáticas de la serie roja y la serie blanca) a nivel sub-crónico y crónico en ratas Sprague Dawley machos. El estudio presenta dos ventajas, la primera es que el modelo utilizado para la inducción química de FCA mediante AOM (10mg/kg) y DSS al 2% por 7 días en el agua para beber, es altamente reproducible y es de gran similitud con la patogénesis en humanos. La segunda es la duración del estudio, que brinda un panorama en una etapa subcrónica y una crónica posteriores a la inducción de FCA.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Cáncer

El cáncer es definido como una enfermedad crónica no transmisible producida por alteraciones en los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis de la célula, principalmente por cambios en su información genética. Debido a esto, la tasa de crecimiento de las células cancerosas sobrepasa a la de muerte programada, siendo independientes de los factores circundantes, lo que propicia la formación de tumores que tienden a crecer de manera invasiva, destruyendo tejidos y órganos sanos (Cox and Sinclair, 1998). En México el (INEGI, 2018) lo indica como la 3ª, después de enfermedades circulatorias y *Diabetes mellitus*.

### 2.2. Etapas del proceso cancerígeno

Se pueden identificar tres etapas principales en el desarrollo del cáncer: iniciación, promoción y progresión. La iniciación consiste en un daño permanente, irreversible y transmisible en el ADN de una célula que posee una ventaja proliferativa, dicho daño al no ser reparado, se fija como una mutación. En la promoción, la célula iniciada recibe señales que incrementan la proliferación celular, generando la expansión clonal y la formación del tumor. Esta etapa puede ser reversible si el tumor se encuentra encapsulado, llamado tumor benigno, de lo contrario pasa a la siguiente etapa. La tercera etapa es la progresión, en la que las células adquieren autonomía y son capaces de migrar a sitios distantes del lugar de donde se originaron, proceso llamado metástasis (Bosch, 2001; Cooper and Hausman, 2004).

Inicia con la aparición secuencial de subpoblaciones genéticamente modificadas y de una heterogeneidad celular incrementada dentro del clon neoplásico. Los cambios genéticos progresivos y acumulativos que se presentan son, entre otros, aneuploidía, pérdida de alelos y amplificación genética. El rasgo distintivo de la

etapa terminal es la metástasis, que consiste en la capacidad de invadir y colonizar órganos distantes (Torroella Kourí *et al.*, 1998).

### 2.2.1. Iniciación

Los organismos multicelulares multiplican constantemente sus células para el crecimiento o el reemplazo de las células perdidas. Dicha proliferación tiene lugar por división celular, este es un proceso continuo que dura toda la vida del organismo. El ciclo celular es altamente regulado y establece un equilibrio entre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (Agrawal, 2015)

Para la generación del cáncer deben acumularse entre 5 o 6 mutaciones en el fenotipo de la célula, es decir, que debe haber una pérdida de equilibrio entre los genes normales relacionados con el control de crecimiento y la sobrevivencia de la célula; llamados protooncogenes, y los genes que inhiben éste crecimiento; llamados genes supresores de tumores. La versión alterada de un protooncogen se denomina oncogén. Los oncogenes codifican formas aberrantes de proteínas las cuales provocan alteraciones metabólicas como el aumento de la proliferación celular (Pawson and Bernstein, 1990; Caldas, 1998). Debido a que las células madre normales y las células cancerosas comparten la capacidad auto-regenerativa y de diferenciación se ha acuñado el término “célula madre de cáncer” (Reya *et al.*, 2001).

### 2.2.2. Promoción

La segunda fase es la fase de promoción. Durante ésta, la célula iniciada se expande clonalmente y de esta manera dar lugar a una población de células transformadas (Moolgavkar and Luebeck, 2003). Dicho suceso está influenciado por factores, como la cinética del crecimiento tumoral, la progresión y heterogenicidad, y la angiogénesis tumoral (Andreeff M, Goodrich DW, 2000).

### 2.2.3. Progresión

Cuando las células transformadas reúnen los cambios genéticos suficientes para poseer un fenotipo maligno, se considera como la última etapa, de la “progresión” (Moolgavkar and Luebeck, 2003). Esta transformación maligna se debe a la amplificación, translocación o la sobreexpresión de oncogenes y la interrupción de la función de genes de tumores (Lee and Muller, 2010).

### 2.3. Cáncer colorectal y FCA

El CRC se encuentra dentro de los 3 primeros tipos de cáncer con mayor incidencia en el mundo, representando el 10.2% de los casos nuevos y representa el 9.2% de las muertes por cáncer, lo que lo posiciona en el 2° lugar en mortalidad, precedido por el cáncer de pulmón (Bray *et al.*, 2018). Los reportes epidemiológicos disponibles en México reportan que el CCR es el tercer tipo de cáncer más incidente y con mayor mortalidad (GLOBOCAN, 2018). Los factores de riesgo que se asocian a CCR son una edad mayor a 65 años en promedio, tabaquismo, obesidad, sedentarismo y una dieta alta en carnes rojas y procesadas, consumo de alcohol mayor a 2 medidas/día y una historia familiar de CCR diagnosticado antes de los 45 años (Rakel, 2017). Generalmente comienza con el desarrollo de FCA, crecimiento un pólipo adenomatoso que se desarrolla en la mucosa del colon, acumulando un mayor grado de malignidad en el paso del tiempo. A los 5, 10 y 20 años el adenoma adquiere un riesgo de convertirse en adenocarcinoma del 2.5%, 8% y 24%, respectivamente (Stryker *et al.*, 1987). La tasa de supervivencia relativa de 5 años registrada en Estados Unidos, integrando todos los estadios del CCR es de 66.6% (Howlander *et al.*, 2014).

El cáncer colorectal envuelve un proceso de diversas etapas, se genera por una alteración en el control de la proliferación del tejido epitelial intestinal, su diferenciación y su muerte. Estos cambios pueden estar dados por la dieta y los factores ambientales, modulando las vías de señalización del epitelio celular intestinal, tales como las mutaciones que transforman protooncogenes, delección o

mutaciones de las enzimas reparadoras del ADN y genes supresores de tumores (Jemal *et al.*, 2002). Para que se genere una neoplasia de colon son requeridas un mínimo de cuatro a cinco mutaciones acumuladas en genes diferentes, entre los que se encuentran APC, K-ras, y p53, cada una de las cuales produce un medio adecuado para la progresión desde el adenoma simple, a través de estadios progresivos de degeneración adenomatosa, hasta el cáncer colorrectal (Fearon and Vogelstein, 1990). Los focos de cripta aberrantes (FCA) son lesiones pre-neoplásicas localizadas en la mucosa y que muestran cambios morfológicos tales como la displasia y la proliferación anormal, también atraviesan por la acumulación de numerosas anomalías genéticas en oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores de ADN, lo que resulta en inestabilidad genómica. Los FCA pueden ser observados y cuantificados microscópicamente, nos sirven como un marcador de riesgo a desarrollar CRC, con el tiempo estas las lesiones se hacen más notorias y menos diferenciadas, adquiriendo el fenotipo de un cáncer con metástasis. Nuestro modelo buscó inducir lesiones pre-neoplásicas, FCA, identificados como la etapa más temprana de la carcinogénesis (Siu *et al.*, 1999; Bird and Good, 2000; Sengottuvelan, Senthilkumar and Nalini, 2006; Ziliotto, Barbisan and Rodrigues, 2008),

#### 2.4 Modelos subcrónicos y crónicos

Es importante destacar la diferencia de un modelo a nivel sub-crónico, que se refiere a una exposición a determinada sustancia durante 90 días, mientras que el crónico es cuando el estudio ha durado más de 90 días en la exposición a dicha sustancia (Parasuraman, 2011).

#### 2.5. Modelos biológicos de CCR

El azoximetano (AOM) es un metabolito de la 1,2- dimetilhidrazina (DMH) , es una sustancia ampliamente usada para el estudio del cáncer de colon por su efecto carcinogénico y la similitud que presenta la patogénesis del crecimiento

espontáneo de carcinoma de colon en humanos (Verghese *et al.*, 2002; Bissahoyo *et al.*, 2005; Chen and Huang, 2009). El AOM sufre varias oxidaciones al ser metabolizado por los mamíferos, y su producto final, es un inductor de metilación aberrante de guanina que genera aductos de ADN lo que genera una alteración del gen APC hasta nivel de replicación, transcripción y traducción. El AOM, al ser absorbido, sufre la hidroxilación en una reacción metabólica de primera fase por parte de la isoforma CYP2E1 del citocromo P450, formando el compuesto metilazoximetanol, que es depositado en el colon por vía biliar y una vez ahí, la alcohol deshidrogenasa lo transforma en metilazoxiformaldehído. Esta enzima presenta alta actividad en este sitio anatómico y le confiere al azoximetano el carácter de ser un fármaco órgano específico (Piñol Felis, 2001).

Por otro lado el dextrano de sulfato sódico (DSS), es un polianión ampliamente aplicado utilizado en modelos que buscan inducir inflamación o lesiones displásicas en colon, el peso molecular del DSS tiene un rol importante para cumplir dicha función, el peso molecular del DSS se encuentra entre los 5 kDa hasta los 1400 kDa, éste interactúa con moléculas cargadas positivamente, como las proteínas; ocasionando que permee en la mucosa intestinal y lo que promoverá un ambiente inflamatorio, lo que a su vez favorecerá el desarrollo de neoplasias (Hong *et al.*, 2010; Terzić *et al.*, 2010; Perše and Cerar, 2012; Yu *et al.*, 2018).

Los modelos roedores de inducción química de CCR y FCA tras la aplicación de AOM y DSS han sido una herramienta útil en el estudio de la patogénesis y en la investigación sobre quimiopreención en este tipo de cáncer, dada su alta incidencia y multiplicidad de neoplasmas de colon a corto plazo (Tanaka *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2005). Para que la inducción química de FCA sea exitosa se deben considerar puntos críticos que influyen en ésta, como la dosificación de los xenobióticos, la cepa de los animales, sexo y edad (Lee, Yum and Surh, 2014).

## 2.6. Importancia de los modelos animales en estudio del cáncer en humanos

Debido a la dificultad de realizar estudios sobre FCA en humanos, se ha optado por el desarrollo de modelos animales que permiten tener un estricto control de las condiciones bajo las que se trabaja, lo que ayuda a tener una mayor aproximación al entendimiento de la patogénesis en el humano (Piñols Felis, 1999). Dado que existen similitudes en las características patológicas del CCR en humanos y el inducido químicamente; es decir, que los mecanismos observados en el epitelio colónico durante la enfermedad humana y el modelo animal muestran alteraciones análogas, esto permite un amplio estudio de diversos aspectos en la carcinogénesis (Maskens, 1976; Tanaka, 2009).

## 2.7. Observaciones en el estado nutricio en modelos murinos de inducción de neoplasmas de colon

Modelos de inducción de CCR similares al de este estudio han medido los cambios en el peso corporal, consumo de alimento y agua, sin embargo no han encontrado diferencias estadísticamente significativas en dichos marcadores (Miyoshi *et al.*, 2011; Shwter *et al.*, 2014), con excepción de uno en el que se reportó una disminución en la ingesta de alimento en el grupo tratado con AOM/DSS (Moreno-Celis *et al.*, 2017).

Respecto a la valoración mediante química sanguínea, diversos estudios buscaban hallar diferencias en glucosa, parámetros relacionados con funcionamiento renal y/o hepático (albúmina, alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa (AST), creatinina y urea) (Tanaka *et al.*, 2009a; Shwter *et al.*, 2014; Al-Henhena *et al.*, 2015) y metabolismo de lípidos (Colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos) (Tanaka *et al.*, 2008; Miyoshi *et al.*, 2011), no obstante, no encontraron diferencias estadísticamente significativas en dichos analitos.

## 2.8. Relación del cáncer con el sistema inmune

La inflamación tiene un papel importante en la patogénesis y la progresión del cáncer, donde se producen alteraciones genéticas que activan oncogenes o inactivan genes supresores del tumores, dichas alteraciones inducen la transcripción de mediadores inflamatorios, esto genera un micro-ambiente inflamatorio relacionado con la carcinogénesis, lo que podría explicar la presencia de células inflamatorias en tumores sin signos clínicos de inflamación (Erlinger, Muntner and Helzlsouer, 2004; Mantovani *et al.*, 2008).

La respuesta inflamatoria sistémica generada ante un tumor, causa cambios en los componentes hematológicos como los leucocitos, específicamente en neutrófilos, linfocitos y monocitos (Absenger *et al.*, 2013). Los neutrófilos y monocitos infiltrados en la masa tumoral favorecen el desarrollo y la progresión de ésta (Mantovani *et al.*, 2008). Por otro lado, un conteo elevado de leucocitos se ha relacionado con un mayor riesgo de mortalidad por cáncer (Lee *et al.*, 2006; Periasamy, C. T. Liu, *et al.*, 2015).

### **III. JUSTIFICACIÓN**

- Dada la relación de la nutrición sobre la alta incidencia y mortalidad de cáncer de colon, es necesario un conocimiento puntual de la progresión tumoral sobre parámetros bioquímicos, de ganancia de peso y de consumo alimenticio.
- El estudio de FCA en un modelo roedor es pertinente ya que la inducción química propuesta, ha mostrado una alta multiplicidad de lesiones pre-neoplásicas en el colon.
- El modelo tiene la ventaja de poseer dos tiempos de análisis (tiempo subcrónico y crónico), lo que permite hacer comparaciones entre ellos sobre el impacto en el estado nutricional a través del tiempo.

### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto sobre los marcadores nutricionales a tiempo sub-crónico y crónico tras la inducción química de focos de criptas aberrantes por azoximetano y sulfato de dextrano sódico en un modelo de rata Sprague Dawley.

#### 4.1. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del AOM y DSS sobre indicadores de ganancia de peso y de consumo alimenticio a tiempo sub-crónico y crónico.
2. Evaluar el efecto del AOM y DSS sobre químicas sanguíneas y biometrías hemáticas a tiempo crónico y sub-crónico.
3. Evaluar el efecto del AOM y DSS sobre la mucosa de colon, mediante conteo de focos de criptas aberrantes.
4. Evaluar el efecto del AOM y DSS sobre tejido hepático, renal y colónico, mediante análisis histopatológicos a tiempo sub-crónico y crónico.

### **V. Hipótesis**

La inducción química de FCA tras la administración de AOM y DSS impacta en el estado nutricional de los animales, produciendo cambios en marcadores nutricios.

### **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### 6.1. Aprobación comité bioética:

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (73FCN2017). Durante la realización del estudio se tomaron en cuenta los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el uso de animales de laboratorio bajo las consideraciones éticas correspondientes.

#### 6.2 Tipo de estudio y modelo animal

Estudio experimental, comparativo y longitudinal. Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de 4 semanas de edad, con administración de alimento y agua potable *ad libitum*, se alimentó a las ratas con Nutri Cubos (Purina, Ciudad de México, México). El alimento estuvo compuesto de 23% de proteína, 3% de grasa,

6% de fibra y 12% de humedad. Se ajustó el ciclo circadiano a 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, temperatura regulada ( $23 \pm 1^\circ \text{C}$ ). Después de una semana de adaptación, se formaron 2 grupos (n= 12 por grupo: grupo 1= control y grupo 2= cáncer de colon inducido químicamente) de manera aleatorizada. Se pesaron a todos los animales una vez por semana, y se registró la cantidad de alimento y agua que consumieron una y tres veces por semana, respectivamente. Se realizaron 2 sacrificios, el primero a la semana 16 del experimento (n=6 por grupo) y el segundo a la semana 32 (n=6 por grupo). El sacrificio se hizo mediante decapitación.

### 6.3. Inducción de FCA

Para la inducción química de FCA por AOM/DSS se utilizó el modelo experimental de (Neufert, Becker and Neurath, 2007) con modificaciones de acuerdo con lo siguiente: El grupo fue administrado con azoximetano (AOM) (Sigma cat. A5486, San Luis, Missouri, EUA.), vía intraperitoneal a una concentración de 10 mg/kg y solución salina como vehículo, a las semanas 2 y 3 de inicio de experimento, seguido de una semana (semana 4) de administración de dextrano de sulfato sódico (DSS) (Sigma cat. D8906, Alemania) al 2% en el agua de bebida como agente inductor de inflamación.

### 6.4. Peso de órganos

Posterior a la decapitación se disecaron el hígado, riñones, corazón, timo, bazo, páncreas, intestino delgado y colon. Todos los órganos fueron pesados en una báscula analítica y los intestinos medidos longitudinalmente. Los pesos de los órganos fueron corregidos por el peso del animal al momento del sacrificio y se analizaron con base al grupo control.

### 6.5. Análisis de muestras

Los órganos obtenidos del sacrificio se fijaron en formaldehído al 10%, para su posterior análisis en otro posible estudio, separando y perfundiendo las porciones del colon ascendente, transversal y descendente para mantener la estructura interna del tejido y otros se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análisis (Adam et al., 2011).

### 6.6 Química sanguínea y biometría hemática

Las 24 muestras de sangre se tomaron durante la decapitación, recuperando la sangre en tubos EDTA y se procesaron en el Kx-21N – Hematology Analyzer y en el Spin 120 para química sanguínea, en la Clínica de Nutrición “Carlos Alcocer Cuarón” de la Facultad de Ciencias Naturales, para obtener químicas sanguíneas de 18 elementos y biometrías hemáticas de la serie roja y la serie blanca.

### 6.7. Cuantificación de FCA

Después de disecar los cólores, se realizó un corte longitudinalmente desde el ano hasta el recto para evaluar la presencia de FCA. La mitad del tejido del colon se fijó en formalina bufferada al 10%, mientras que la otra mitad se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para un posible análisis posterior. El análisis topográfico de la mucosa colónica se realizó de acuerdo al protocolo de (Bird and Good, 2000), de la siguiente manera: los cólores se tiñieron con solución de azul de metileno al 0.2% durante 5 min y se determinó el número total de FCA. Posteriormente se utilizaron las variables de multiplicidad para cuantificar las criptas aberrantes. Las criptas aberrantes se distinguieron del tejido normal por su aumento de tamaño, altura y zona pericriptal discernible. La multiplicidad de criptas aberrantes se determinó como el número de criptas: 1 cripta, 2 criptas, 3 criptas y 4 o más criptas en cada foco y el total de focos aberrantes.

## 6.8 Análisis histopatológico

Los tejidos se deshidrataron usando concentraciones crecientes de etanol y se embebieron en parafina utilizando un Histoquinete (Leica TP1020). Se obtuvieron cortes de tejido de 4  $\mu\text{m}$  y se montaron en portaobjetos con agua caliente. Los tejidos se rehidrataron usando concentraciones decrecientes y se tiñeron con hematoxilina y eosina, luego se deshidrataron nuevamente usando concentraciones crecientes de etanol y se sellaron con Entellan y un cubreobjetos. Las microfotografías e interpretaciones se realizaron bajo un microscopio (LEICA ICC50 HD, Nussloch, Alemania) utilizando un aumento de 10-40X basado en la morfología del tejido normal de hígado, riñón y colon. Los análisis fueron interpretados por un histopatólogo veterinario dentro de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, México.

## 6.9. Análisis estadístico

Se utilizó una *prueba T de Student* no pareada para determinar las diferencias entre los 2 grupos, utilizando una significancia estadística de  $p < 0.05$ . Se consideró un intervalo de confianza del 95%. Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism.

# VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 7.1. Registro de peso corporal, consumo de alimento y agua.

Modelos murinos de quimioprevención, en los que se registró el peso corporal de las ratas y el consumo de agua y alimento, no reportaron cambios estadísticamente significativos para dichos parámetros entre los grupos positivos a cáncer y los grupos control (Miyoshi *et al.*, 2011; Shwter *et al.*, 2014; Periasamy, C. T. Liu, *et al.*, 2015; Rosa *et al.*, 2015), a excepción de la observación que hace (Moreno-Celis *et al.*, 2017), en su estudio, el grupo inducido con AOM/DSS tuvo

una disminución de peso de hasta el 25%, del que logró recuperar el 5% al final del experimento. Los datos presentados en la Tabla 1 y Tabla 2 muestran el promedio  $\pm$  la desviación estándar del peso inicial, el peso final y el total de peso ganado en las ratas de los grupos Control y AOM/DSS, a tiempo subcrónico y crónico, respectivamente.

Tabla 1. Cambios en el peso corporal (subcrónico)

	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia de peso (g)
Control	144.3 $\pm$ 4.2	436.0 $\pm$ 13.0	291.7 $\pm$ 9.8
AOM/DSS	143.8 $\pm$ 4.8	442.5 $\pm$ 9.8	270.6 $\pm$ 13.4

Media  $\pm$  DS.

T de Student \* $p > 0.05$

Tabla 2. Cambios en el peso corporal (crónico)

	Peso inicial (g) (mean)	Peso final (g)	Ganancia de peso (g)
Control	147.0 $\pm$ 5.4	470.8 $\pm$ 10.7	323.8 $\pm$ 8.0
AOM/DSS	146.8 $\pm$ 5.7	492.4 $\pm$ 23.2	347.5 $\pm$ 19.4

Media  $\pm$  DS.

T de Student \* $p > 0.05$

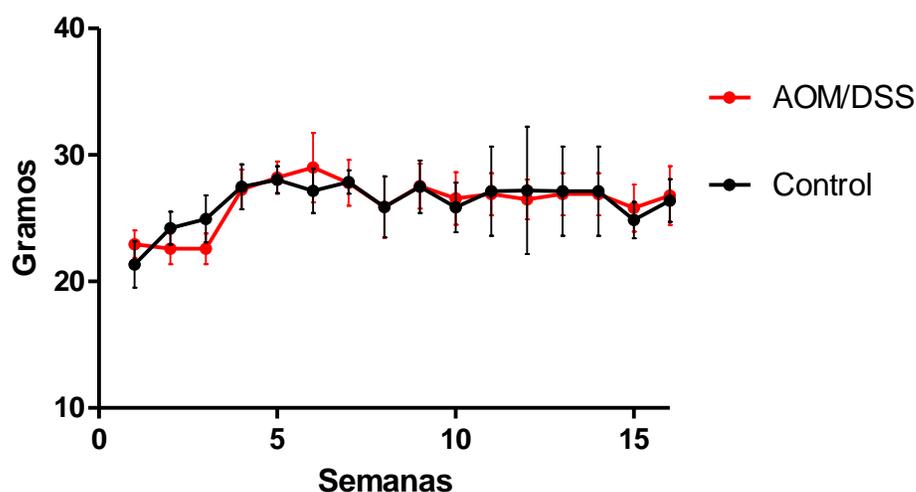


Figura 1. Consumo de alimento (subcrónico)



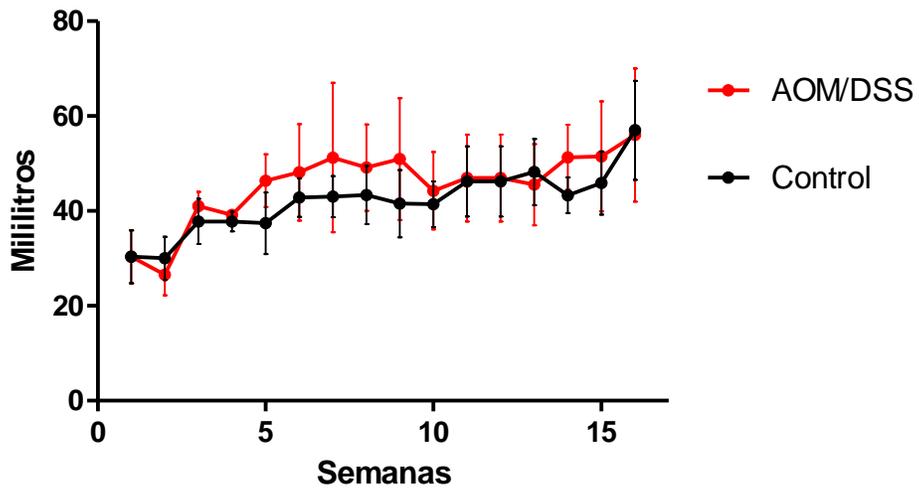


Figura 2. Consumo de agua (subcrónico)

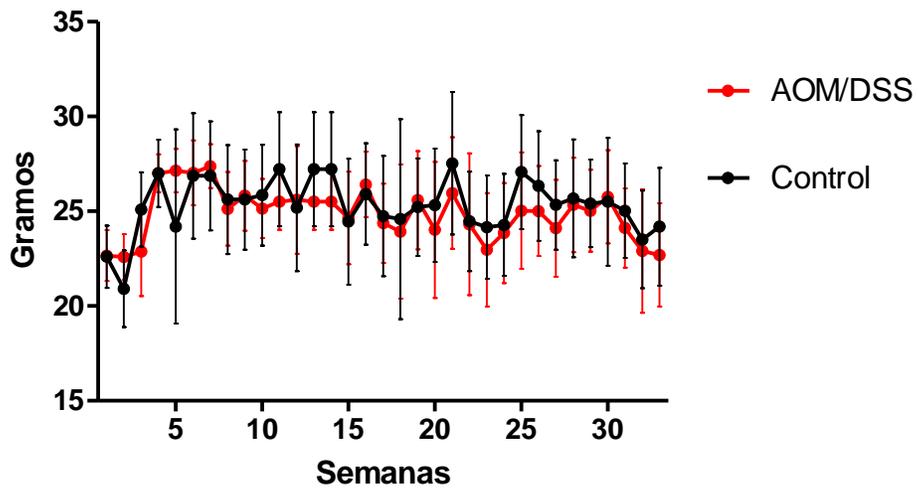


Figura 3. Consumo de alimento (crónico)

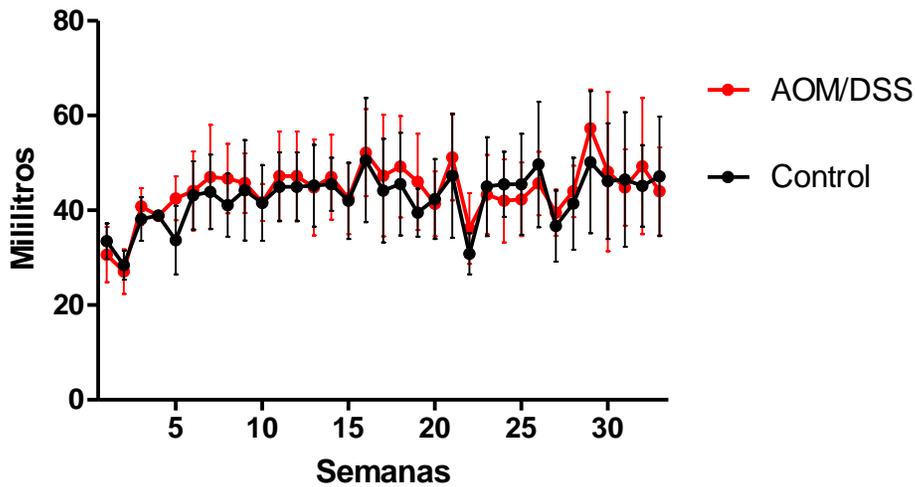


Figura 4. Consumo de agua (crónico)

## 7.2. Peso de órganos

El pesaje de los órganos en el sacrificio reveló una disminución estadísticamente significativa en el peso del hígado, probablemente por la generación de esteatosis reportada por varios autores. Como reportó (Burlamaqui *et al.*, 2013), quienes refieren la sustitución del tejido hepático por tejido adiposo, dado que los animales seniles pueden presentar degeneraciones en el hígado, como áreas de células adiposas, vacuoladas e inflamadas, con núcleos más voluminosos e irregulares, que son más ligeras que los hepatocitos normales. Por otro lado, el colon, como ya se ha descrito, tiende a generar hiperplasia e hipertrofia dentro de las criptas transformándolas en FCA, aumenta así el tamaño del colon en el grupo tratado con AOM/DSS (Perše and Cerar, 2012). No hay reportes del peso de órganos al sacrificio para comparar nuestros resultados. Debido a eso es muy interesante observar su comportamiento.

Tabla 3. Comparación del peso de los órganos en unidades arbitrarias ajustadas, al final del estudio.

	Subcrónico				Crónico			
	Control (mean ± SD)		AOM/DSS (mean ± SD)		Control (mean ± SD)		AOM/DSS (mean ± SD)	
Hígado	1.00	± 0.04	1.03	± 0.07	1.00	± 0.16	0.85	± 0.07*
Riñon	1.00	± 0.09	1.03	± 0.09	1.00	± 0.21	0.90	± 0.12
Corazón	1.00	± 0.04	1.01	± 0.05	1.00	± 0.16	1.06	± 0.16
Timo	1.00	± 0.54	1.16	± 0.62	1.00	± 0.65	1.06	± 0.28
Bazo	1.00	± 0.25	1.16	± 0.19	1.00	± 0.54	0.88	± 0.23
Páncreas	1.00	± 0.16	1.09	± 0.22	1.00	± 0.15	0.96	± 0.28
Int delgado (peso)	1.00	± 0.06	1.02	± 0.06	1.00	± 0.08	1.01	± 0.11
Int delgado (longitud)	1.00	± 0.07	0.99	± 0.04	1.00	± 0.09	1.02	± 0.10
Colon (peso)	1.00	± 0.04	1.04	± 0.05	1.00	± 0.15	1.16	± 0.15*
Colon (longitud)	1.00	± 0.18	1.01	± 0.12	1.00	± 0.18	1.12	± 0.07*

Las unidades arbitrarias mostradas son tomando como referencia el grupo control en relación con el peso del animal en el sacrificio. T de Student para muestras independientes \*  $p < 0.05$ .

### 7.3. Cuantificación de focos de criptas aberrantes

Se cuantificó el número de FCA formados por 1 cripta, 2 criptas, 3 criptas y 4 o más criptas como lo hizo (Corrales *et al.*, 2016), para evaluar el grado de lesiones pre-neoplásicas entre el grupo AOM/DSS subcrónico y crónico, mostrados en la Figura 7 y Figura 8.

En la Figura 9. Se muestran fotografías tomadas en el microscopio al hacer el análisis morfológico de la mucosa colónica de las ratas del grupo AOM/DSS, el tipo de lesión más importante que encontramos en nuestro modelo fueron microadenomas, que se definen como los FCA de 10 o más criptas (Roncucci, Medline and Bruce, 1991), no se encontraron criptas aberrantes en el grupo Control. La comparación del número de FCA entre la exposición subcrónica y crónica del grupo AOM/DSS en la Figura 10. Mostró una diferencia estadísticamente

significativa, lo que presume una progresión patológica de la carcinogénesis, como lo han relacionado otros autores (Roncucci, Medline and Bruce, 1991; Archer *et al.*, 1992; De Robertis *et al.*, 2011).

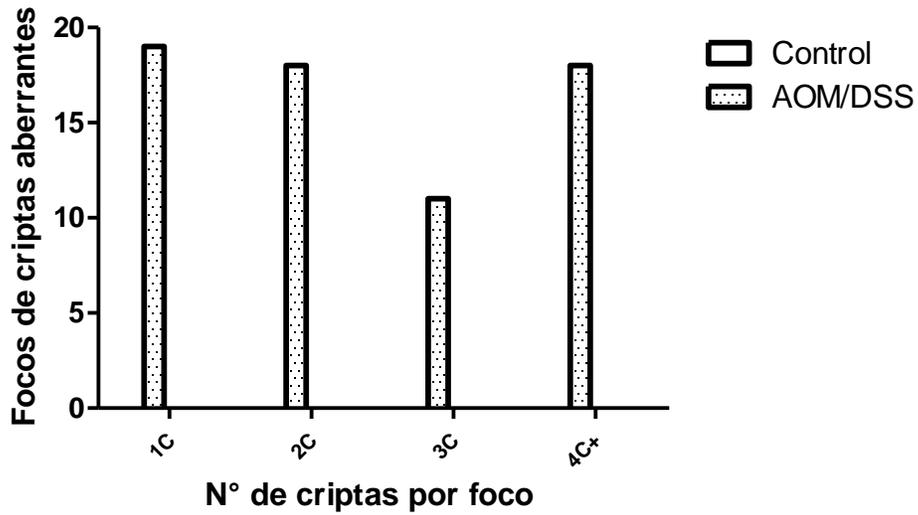


Figura 5. FCA por número de criptas (subcrónico)

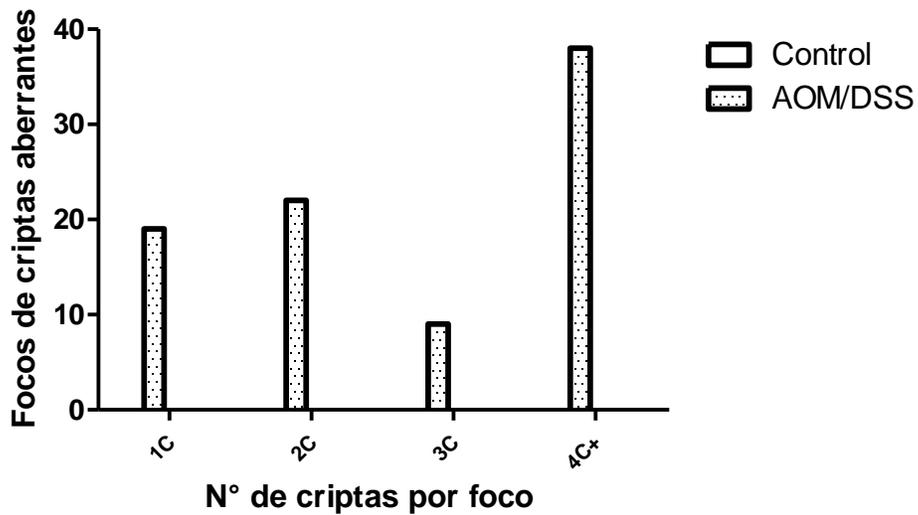


Figura 6. FCA por número de criptas (crónico)

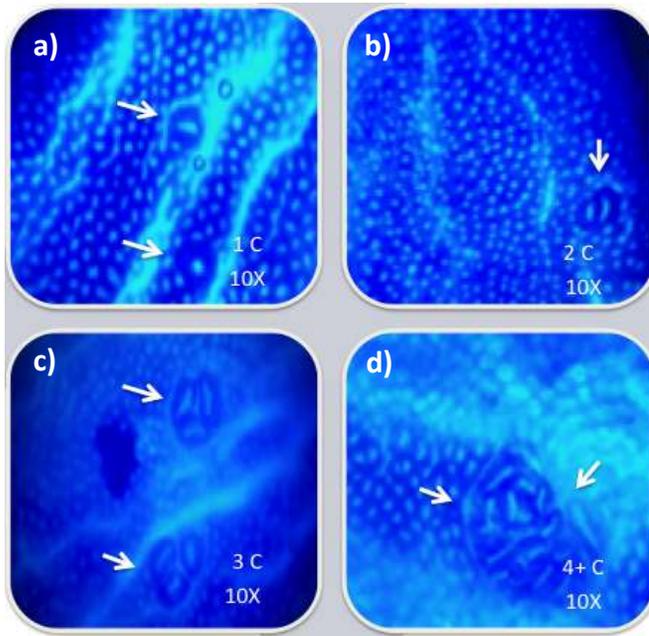


Figura 7. Imágenes representativas de FCA de a) 1 cripta, b) 2 criptas, c) 3 criptas y d) 4 criptas o más, presentes en la mucosa colónica de las ratas AOM/DSS.

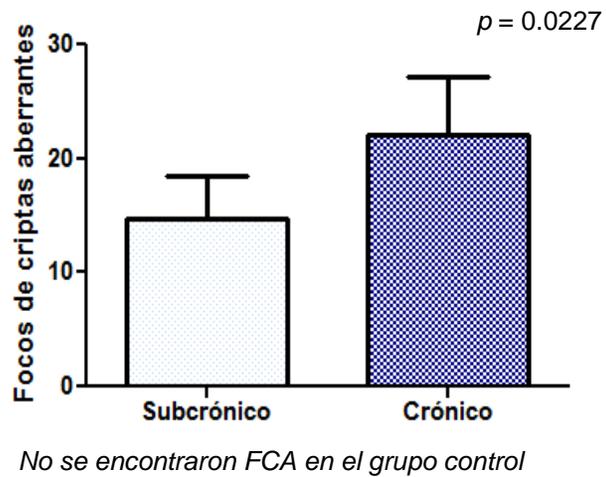


Figura 8. Comparación del número de FCA en el grupo AOM/DSS subcrónico y crónico.

#### 7.4. Biometrías hemáticas

En la Tabla 4. y Tabla 5. se resumen los valores obtenidos de las biometrías hemáticas llevadas a cabo en ambos grupos experimentales, a nivel subcrónico se encontraron diferencias estadísticamente significativas leucocitos y linfocitos, cuyos recuentos fueron mayores en el grupo AOM/DSS, hallazgo que coincide con las observaciones de (Periasamy, C.-T. Liu, *et al.*, 2015), quien lo relaciona con la respuesta del sistema inmune a la carcinogénesis.

De la comparación los grupos sacrificados a las 32 semanas, se destaca la disminución estadísticamente significativa de hemoglobina (HGB), hemoglobina corpuscular media (MCH) y volumen plaquetario medio (VPM), en el grupo AOM/DSS. Para el caso de la HGB y MCH, ambos valores están dentro de los rangos de normalidad para ratas Sprague Dawley (He *et al.*, 2017), por lo tanto no se podría asociar a una posible anemia en un estadio temprano de la patogénesis; otros modelos en roedores no reportan diferencias entre los grupos Control y los inducidos con AOM/DSS para dichos parámetros (Kim *et al.*, 2011; Myung *et al.*, 2015). El VPM es un valor relacionado con enfermedades inflamatorias, una de ellas, la enfermedad inflamatoria intestinal, mientras más aguda sea la inflamación, la activación y el consumo plaquetario, el VPM se verá disminuido (Kapsoritakis *et al.*, 2001), por lo que se puede asociar su disminución con el ambiente inflamatorio producido por los xenobióticos.

Tabla 4. Biometría hemática subcrónico a grupo Control y AOM/DSS.

	Control		AOM/DSS		P
WBC (k/ $\mu$ L)	7.67	$\pm$ 0.63	9.98	$\pm$ 0.91	0.0324*
LYM (k/ $\mu$ L)	6.47	$\pm$ 0.57	8.28	$\pm$ 0.69	0.0353*
LYM (%)	84.20	$\pm$ 1.13	83.37	$\pm$ 1.66	0.3433
RBC (M/ $\mu$ L)	8.37	$\pm$ 0.18	8.29	$\pm$ 0.12	0.3753
HGB (g/dL)	15.75	$\pm$ 0.27	15.75	$\pm$ 0.15	0.5000
HCT (%)	44.23	$\pm$ 0.70	45.08	$\pm$ 0.69	0.2026
MCV (fL)	52.93	$\pm$ 0.74	54.37	$\pm$ 0.63	0.0864
MCH (pg)	18.83	$\pm$ 0.29	19.02	$\pm$ 0.29	0.3330
MCHC (g/dL)	35.62	$\pm$ 0.34	34.93	$\pm$ 0.34	0.0949
PLT (k/ $\mu$ L)	941.5	$\pm$ 45.95	912.7	$\pm$ 57.31	0.3515
MPV (fL)	7.18	$\pm$ 0.16	7.27	$\pm$ 0.14	0.3498
RDW_SD (fL)	29.48	$\pm$ 0.33	29.40	$\pm$ 0.13	0.4097
RDW %	14.67	$\pm$ 0.58	13.63	$\pm$ 0.14	0.0569

Media  $\pm$  DS

T de Student \*P>0.05

Tabla 5. Biometría hemática crónico a grupo Control y AOM/DSS.

	Control		AOM/DSS		P
WBC (k/ $\mu$ L)	8.98	$\pm$ 0.49	7.90	$\pm$ 0.37	0.0534
LYM (k/ $\mu$ L)	6.85	$\pm$ 0.31	6.27	$\pm$ 0.23	0.0825
LYM (%)	76.48	$\pm$ 1.59	79.63	$\pm$ 1.91	0.1171
RBC (M/ $\mu$ L)	8.83	$\pm$ 0.18	8.86	$\pm$ 0.16	0.4463
HGB (g/dL)	16.75	$\pm$ 0.18	16.18	$\pm$ 0.23	0.0422*
HCT (%)	47.22	$\pm$ 0.85	46.47	$\pm$ 0.94	0.2839
MCV (fL)	53.50	$\pm$ 0.69	52.42	$\pm$ 0.20	0.0816
MCH (pg)	18.98	$\pm$ 0.31	18.27	$\pm$ 0.13	0.0305*
MCHC (g/dL)	35.50	$\pm$ 0.34	34.87	$\pm$ 0.30	0.0984
PLT (k/ $\mu$ L)	905.2	$\pm$ 76.07	851.7	$\pm$ 29.70	0.2636
MPV (fL)	7.68	$\pm$ 0.09	7.40	$\pm$ 0.02	0.0095**
RDW_SD (fL)	29.87	$\pm$ 0.26	29.65	$\pm$ 0.09	0.2264
RDW %	15.92	$\pm$ 0.82	15.65	$\pm$ 0.57	0.3979

Media  $\pm$  DS

T de Student \*P>0.05

### 7.5. Químicas sanguíneas.

En la Tabla 6 y Tabla 7 se observan los valores obtenidos del análisis del suero hemático de ambos grupos a las 16 y 32 semanas del experimento. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la glucosa. (Matkowskyj *et al.*, 1999) reportaron un descenso en la glucosa sérica con una dosis de AOM (100 µg/g) en ratones macho C57BL/6J y en ratas Sprague Dawley. (Hata *et al.*, 2012) no reportaron diferencia estadística entre AOM y el grupo control, pero si reportaron una tendencia a aumentar la glucosa con el tratamiento con AOM en ratones Crj:CD-1 (ICR) con 4 administraciones de AOM (15 mg/kg). A diferencia de (Hirose *et al.*, 2003), quienes reportaron los niveles de glucosa en sangre estadísticamente diferentes en ratones C57BL /KsJ- db / db entre el control y el grupo AOM (15 mg/kg) una vez por semana, durante 5 semanas, lo que sugiere que la resistencia a la insulina podría ocurrir. Hay evidencia acumulada que sugiere que la hiperinsulinemia está involucrada en la carcinogénesis de colon, así como en la obesidad y la diabetes. Varios estudios epidemiológicos indican que los pacientes diabéticos con hiperinsulinemia tienen un mayor riesgo de cáncer de colon (Hirose *et al.*, 2003). A tiempo subcrónico se identifica la alteración en colesterol total, otros estudios que midieron el mismo analito no encontraron diferencias en dicho parámetro (Tanaka *et al.*, 2008, 2009b). No obstante, nuestro resultado se encuentra dentro de los valores normales de colesterol total para ratas Sprague Dawley (Caridad *et al.*, 2011), por lo que no puede utilizarse a este grado como un marcador que refiera carcinogénesis.

Tabla 6. Química sanguínea subcrónico a grupo Control y AOM/DSS.

	Control	AOM/DSS	P
Glucosa (mg / dL)	115.20 ± 6.79	94.37 ± 7.31	0.0318*
Triglicéridos (mg / dL)	46.25 ± 7.43	44.12 ± 2.71	0.3964
Total colesterol (mg / dL)	71.87 ± 4.58	60.92 ± 2.67	0.0329*
HDL-c (mg / dL)	47.03 ± 3.88	42.62 ± 2.76	0.1880
LDL-c (mg / dL)	33.83 ± 5.27	27.17 ± 2.45	0.1393
VLDL-c (mg / dL)	9.33 ± 1.49	8.67 ± 0.56	0.3427
Ácido úrico (mg / dL)	1.40 ± 0.11	1.43 ± 0.08	0.4038
Urea (mg / dL)	47.30 ± 2.79	42.07 ± 3.47	0.1334
Creatinina (mg / dL)	0.68 ± 0.05	0.60 ± 0.04	0.0814
BUN (mg / dL)	22.17 ± 1.25	19.67 ± 1.67	0.1289
Bilirrubina total (mg / dL)	0.49 ± 0.05	0.48 ± 0.07	0.4502
Bilirrubina directa (mg / dL)	0.39 ± 0.46	0.44 ± 0.11	0.3468
Bilirrubina indirecta (mg/dL)	0.09 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.3794
TGP/ALT (U/L)	67.33 ± 3.47	65.33 ± 7.25	0.4043
TGO/AST (U/L)	168.2 ± 8.94	159.80 ± 12.52	0.2999
Proteínas totales (g/dL)	6.35 ± 0.15	5.97 ± 0.66	0.2929
Albumina (g/dL)	3.63 ± 0.07	3.28 ± 0.23	0.0851
Globulina (mg/dL)	2.83 ± 0.17	2.83 ± 0.54	0.5000
A/G	1.00 ± 0.00	1.17 ± 0.41	0.5000

Media ± DS

T de Student \*P>0.05

Tabla 7. Química sanguínea crónica a grupo Control y AOM/DSS

	Control	AOM/DSS	P
Glucosa (mg / dL)	127.5 ± 2.53	114.8 ± 3.12	0.0050**
Triglicéridos (mg / dL)	131.7 ± 34.19	88.68 ± 18.10	0.1459
Total colesterol (mg / dL)	91.27 ± 8.53	84.05 ± 10.02	0.2977
HDL-c (mg / dL)	28.60 ± 2.55	25.28 ± 2.86	0.2036
LDL-c (mg / dL)	36.17 ± 3.79	41.00 ± 8.95	0.3149
VLDL-c (mg / dL)	26.17 ± 6.82	17.83 ± 3.61	0.1527
Ácido úrico (mg / dL)	0.88 ± 0.12	1.15 ± 0.13	0.0838
Urea (mg / dL)	56.40 ± 7.03	44.45 ± 2.75	0.0722
Creatinina (mg / dL)	0.62 ± 0.02	0.65 ± 0.03	0.2005
BUN (mg / dL)	26.33 ± 3.25	20.67 ± 1.28	0.0681
Bilirrubina total (mg / dL)	0.43 ± 0.03	0.52 ± 0.05	0.0843
Bilirrubina directa (mg / dL)	0.30 ± 0.02	0.36 ± 0.04	0.1693
Bilirrubina indirecta (mg/dL)	0.12 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.0515
Fosfatasa alcalina	223 ± 17.26	267.23 ± 17.26	0.1643
TGO/AST (U/L)	116.7 ± 2.52	113.50 ± 5.78	0.3132
TGP/ALT (U/L)	73.67 ± 2.12	79.00 ± 14.20	0.3591
Proteínas totales (g/dL)	6.57 ± 0.08	6.58 ± 0.10	0.4510
Albumina (g/dL)	3.43 ± 0.07	3.43 ± 0.07	0.5000
Globulinas (mg/dL)	2.83 ± 0.17	2.83 ± 0.54	0.5000
A/G	1.00 ± 0.00	1.17 ± 0.41	0.5000

Media ± SD

T de Student \*P>0.05

## 7.6. Análisis histopatológico

Dentro de los análisis histopatológicos de órganos blanco del metabolismo y la excreción del AOM se observa, tal como reportó (Kobaek-Larsen, Morten Fenger, Claus Ritskes-Hoitinga, 2004); en ratas BDIX/Orllco hembras y machos con una administración de 2 inyecciones por semana de AOM (15 mg/kg) en un periodo de dos semanas, con una semana intermedia de descanso, un mayor número de linfocitos infiltrantes y vasos sanguíneos dilatados en ratas tratadas con AOM en comparación con ratas no tratadas. Los vasos sanguíneos dilatados podrían ser un estado previo a tumores hemangiomas, como ocurrió en el estudio de Kobaek

et al., con el hígado de ratas tratadas con AOM después de períodos de latencia más prolongados.

Modelos de inducción de lesiones hepáticas con AOM, mediante análisis histopatológicos han observado su efectividad produciendo hiperplasia ductual y hepatotoxicidad, lo que se confirma en nuestro modelo (Shan *et al.*, 2007; Khurana *et al.*, 2010). Las hiperplasias de conductos biliares podrían deberse a un efecto tóxico y la posterior regeneración de las células hepáticas, ya que el pleomorfismo es un hallazgo común en esta afección. Alternativamente, la proliferación también podría ser un efecto directo del carcinógeno.

En cuanto al riñón ocurre lo mismo, diversos estudios que hablan sobre la inducción de cáncer en riñón por AOM (Sunter and Senior, 1983). Pero en nuestro estudio no observamos ninguna neoplasia, solamente inflamación en los glomérulos que pudiera ser un pre-estado de tumorigénesis en riñón mediado por AOM. En cuanto al colon, se observaron focos de criptas aberrantes que fueron en aumento conforme al tiempo en las dos etapas de estudio, sin encontrar tumores. Debido a esto no es necesario llevar el modelo de estudio hasta las 32 semanas, sino, con 16 semanas es suficiente para poder evaluar un posible efecto preventivo con los FCA observados.

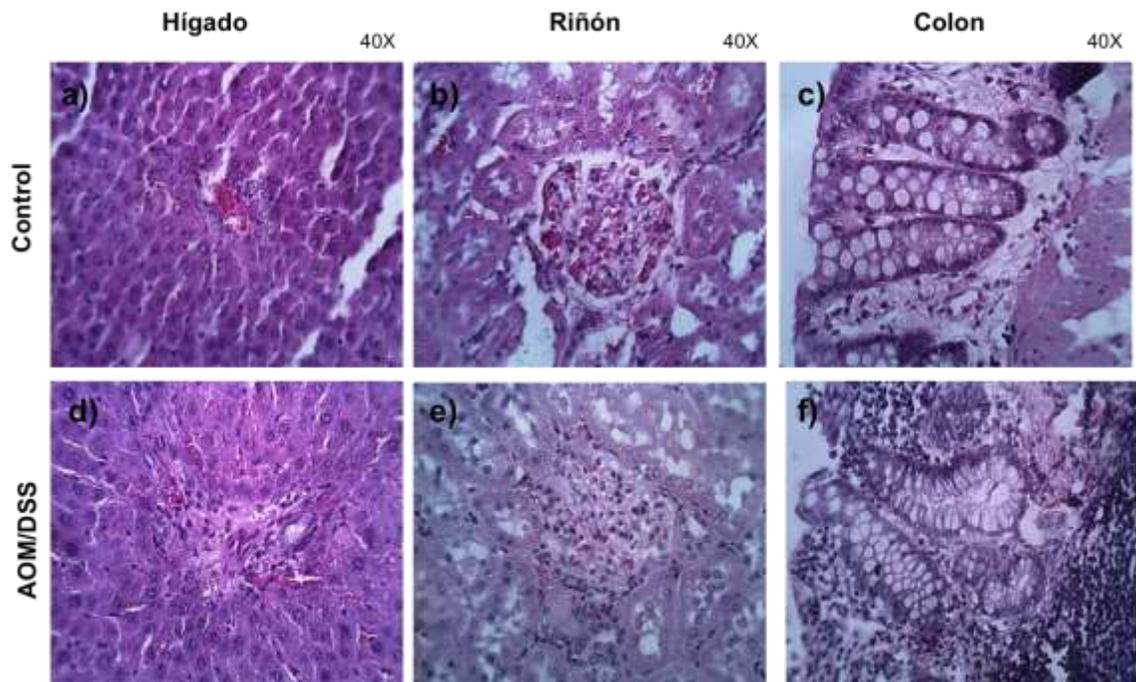


Figura 9. Subcrónico. Fotografías tomadas en microscopio de secciones de hígado, riñón y colon transverso, teñidos con hematoxilina y eosina. (a-c) muestran la histología normal de los tejidos de las ratas del grupo control. d) fibrosis e hiperplasia del conducto biliar en hígado, e) pérdida de la estructura de la cámara de Bowman por inflamación, f) filtración linfocitaria a la lámina propia del colon.

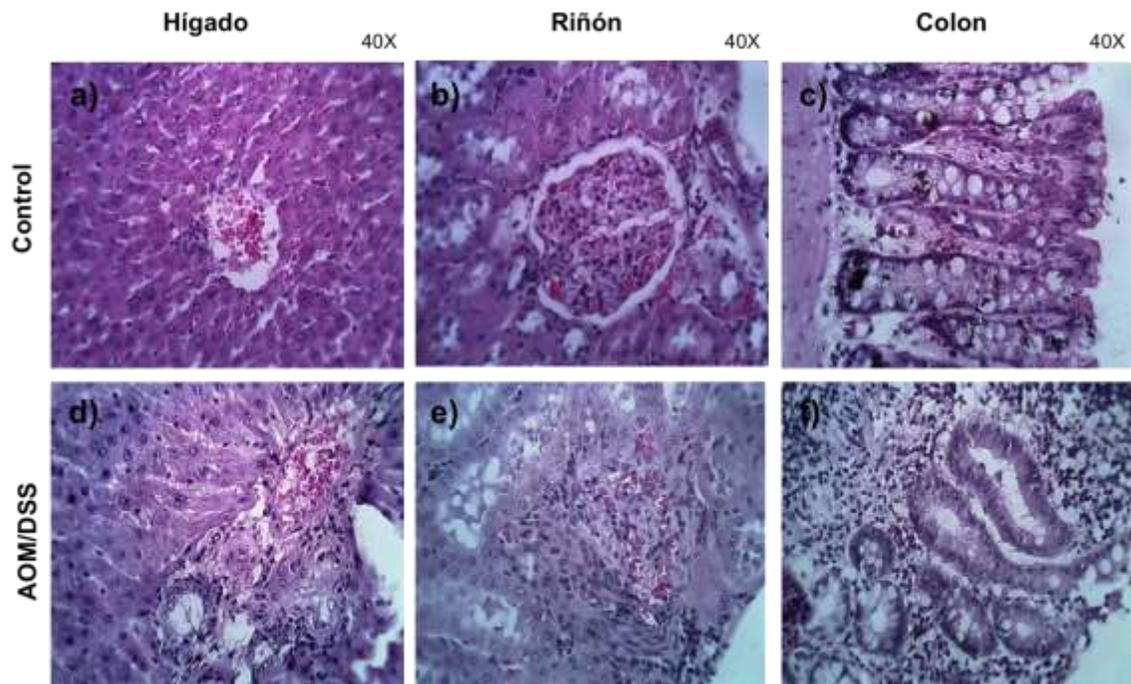


Figura 10. Crónico. Fotografías tomadas en microscopio de secciones de hígado, riñón y colon transverso, teñidos con hematoxilina y eosina. (a-c) muestran la histología normal de los tejidos de las ratas del grupo control. Las lesiones producidas por la exposición crónica fue de mayor grado en los tres órganos, en comparación con las de un periodo subcrónico; d) fibrosis e hiperplasia del conducto biliar en hígado, e) fibrosis e inflamación en el glomérulo, pérdida de la estructura de la cámara de Bowman, f) filtración linfocitaria a la lámina propia del colon y pérdida de la arquitectura del tejido, la placa de peyer invadió la lámina propia.

## VIII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se confirmaron lesiones pre-neoplásicas con la presencia de focos de criptas aberrantes en el modelo inducido químicamente por AOM y DSS. El modelo de rata utilizado resultó en una incidencia altamente reproducible de la inducción de FCA a las 16 y 32 semanas. Puede ser llevado solamente a las 16 semanas y así minimizar costos, generado un modelo más económico para el estudio de la prevención de los FCA. Asimismo, se determinó el efecto sobre marcadores nutricios. No se registraron cambios en la ganancia de peso, ni en el consumo de alimento y agua. Se observaron variaciones bioquímicas que resultan de importancia mantenerlas en consideración al momento de reproducir el modelo para evitar falsos positivos, además hubo una respuesta del sistema inmune evidenciada por la infiltración de linfocitos hacia la lámina propia dentro de los análisis histopatológicos. Asimismo, se observó un aumento de los valores de leucocitos y linfocitos en sangre en los animales tratados con AOM/DSS. Al mismo tiempo, se observaron efectos secundarios asociados con el tratamiento de la AOM en órganos responsables de su metabolismo y excreción. Con base a lo anterior, se sugiere que un tratamiento de AOM (10 mg/kg), con 7 días de DSS en el agua para beber al 2% en tiempo subcrónico y crónico, no sólo genera lesiones pre-neoplásicas, sino también daño en órganos blanco. Por ello se deben considerar todos los cambios observados al momento de estudiar los posibles efectos quimiopreventivos de un componente al aplicar este modelo. Son necesarios más estudios para poder determinar el mecanismo de los cambios observados en el presente modelo.

## IX. LITERATURA CITADA

Absenger, G. *et al.* (2013) 'A derived neutrophil to lymphocyte ratio predicts clinical outcome in stage II and III colon cancer patients', *British Journal of Cancer*, 109(2), pp. 395–400. doi: 10.1038/bjc.2013.346.

Agrawal, S. (2015) 'The factors influencing carcinogenesis and its genetic and molecular basis', *Archives of International Surgery*. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd., 5(1), pp. 1–6. doi: 10.4103/2278-9596.153138.

Al-Henhena, N. *et al.* (2015) 'Chemopreventive effects of *Strobilanthes crispus* leaf extract on azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rat colon', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5(January), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep13312.

Andreeff M, Goodrich DW, P. A. (2000) *Cancer medicine: Cell proliferation, differentiation, and apoptosis*. 5th edn. BC Decker.

Archer, M. C. *et al.* (1992) 'Aberrant Crypt Foci and Microadenoma As Markers for Colon Cancer', *Environmental Health Perspectives*. The National Institute of Environmental Health Sciences, 98, p. 195. doi: 10.2307/3431269.

Bird, R. P. and Good, C. K. (2000) 'The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer.', *Toxicology letters*, 112–113, pp. 395–402. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10720758> (Accessed: 13 March 2019).

Bissahoyo, A. *et al.* (2005) 'Azoxymethane Is a Genetic Background-Dependent Colorectal Tumor Initiator and Promoter in Mice: Effects of Dose, Route, and Diet', *Toxicological Sciences*, 88(2), pp. 340–345. doi: 10.1093/toxsci/kfi313.

Bosch, A. L. (2001) 'Bases estructurales de las neoplasias: Fundamentos morfológicos de la transformación maligna', *Monografías de la Real Academia*

*Nacional de Farmacia*, 0(0). doi: es/monoranf.v0i0.432.

Bray, F. *et al.* (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. American Cancer Society. doi: 10.3322/caac.21492.

Burlamaqui, I. M. B. *et al.* (2013) 'Repercussão hepática da carcinogênese colorretal induzida pelo azoximetano', *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 40(2), pp. 137–141. doi: 10.1590/S0100-69912013000200010.

Caldas, C. (1998) 'Molecular assessment of cancer.', *BMJ (Clinical research ed.)*. British Medical Journal Publishing Group, 316(7141), pp. 1360–3. doi: 10.1136/BMJ.316.7141.1360.

Caridad, L. G. A. *et al.* (2011) 'Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD', *Revista Electronica de Veterinaria*, 12(11), pp. 1–10.

Chen, J. and Huang, X.-F. (2009) 'The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications.', *Cancer biology & therapy*, 8(14), pp. 1313–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19502780> (Accessed: 23 January 2019).

Cooper, G. M. and Hausman, R. E. (2004) 'The Cell: molecular approach'. *Medicinska naklada*. Available at: <https://bib.irb.hr/prikazi-rad?rad=182844> (Accessed: 17 September 2018).

Corrales, A. *et al.* (2016) 'Mango (*Mangifera indica* cv. Azucar) antiinflammatory and chemopreventive role during colorectal carcinogenesis', *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(10), p. 704. doi: 10.9755/ejfa.2015-08-593.

Cox, T. M. and Sinclair, J. (1998) 'Biología molecular en medicina'. *Médica Panamericana*, Available at: <http://www.sidalc.net/cgi->

bin/wxis.exe/?IsisScript=UCC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=098988 (Accessed: 17 September 2018).

Erlinger, T. P., Muntner, P. and Helzlsouer, K. J. (2004) 'WBC count and the risk of cancer mortality in a national sample of U.S. adults: results from the Second National Health and Nutrition Examination Survey mortality study.', *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 13(6), pp. 1052–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15184263>.

Fearon, E. R. and Vogelstein, B. (1990) 'A genetic model for colorectal tumorigenesis.', *Cell*, 61(5), pp. 759–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2188735> (Accessed: 20 January 2019).

GLOBOCAN (2018) *Mexico Source: Globocan 2018*. Available at: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf> (Accessed: 19 December 2018).

Hata, K. *et al.* (2012) 'Monosodium glutamate-induced diabetic mice are susceptible to azoxymethane-induced colon tumorigenesis', *Carcinogenesis*. Oxford University Press, 33(3), pp. 702–707. doi: 10.1093/carcin/bgr323.

He, Q. *et al.* (2017) 'Sex-specific reference intervals of hematologic and biochemical analytes in Sprague-Dawley rats using the nonparametric rank percentile method', *PLOS ONE*. Edited by C. Johnson, 12(12), p. e0189837. doi: 10.1371/journal.pone.0189837.

Hirose, Y. *et al.* (2003) 'Enhancement of development of azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in C57BL/KsJ-db/db mice', *Carcinogenesis*. Oxford University Press, 25(5), pp. 821–825. doi: 10.1093/carcin/bgh059.

Hong, S. *et al.* (2010) 'Connection between inflammation and carcinogenesis in gastrointestinal tract: focus on TGF-beta signaling.', *World journal of gastroenterology*, 16(17), pp. 2080–93. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20440848> (Accessed: 24 January 2019).

Howlander, N. *et al.* (2014) *SEER cancer statistics review, 1975-2011*, National Cancer Institute, Bethesda, MD. Available at: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2015/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/) (Accessed: 19 September 2018).

INEGI (2018) *COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 525/18*. Available at: <http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodem/DEFUNCIONES2017.pdf> (Accessed: 20 January 2019).

Jemal, A. *et al.* (2002) 'Cancer statistics, 2002.', *CA: a cancer journal for clinicians*, 52(1), pp. 23–47. doi: 10.3322/canjclin.52.1.23.

Kapsoritakis, A. N. *et al.* (2001) 'Mean platelet volume: a useful marker of inflammatory bowel disease activity', *The American Journal of Gastroenterology*, 96(3), pp. 776–781. doi: 10.1111/j.1572-0241.2001.03621.x.

Khurana, S. *et al.* (2010) 'Scopolamine Treatment and Muscarinic Receptor Subtype-3 Gene Ablation Augment Azoxymethane-Induced Murine Liver Injury', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333(3), pp. 639–649. doi: 10.1124/jpet.109.165118.

Kim, J.-H. *et al.* (2011) 'Effects of Selenium on Colon Carcinogenesis Induced by Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate in Mouse Model with High-Iron Diet', *Laboratory Animal Research*, 27(1), p. 9. doi: 10.5625/lar.2011.27.1.9.

Kobaek-Larsen, Morten Fenger, Claus Ritskes-Hoitinga, J. (2004) 'Secondary effects induced by the colon carcinogen azoxymethane in BDIX rats', *APMIS*, 112(6), pp. 319–329. doi: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm1120601.x.

Lee, E. Y. H. P. and Muller, W. J. (2010) 'Oncogenes and tumor suppressor genes.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2(10), p. a003236. doi: 10.1101/cshperspect.a003236.

Lee, H.-N., Yum, H.-W. and Surh, Y.-J. (2014) 'The Azoxymethane Plus Dextran Sulfate Sodium-Induced Mouse Colon Cancer Model for the Study of Dietary Chemoprevention of Inflammation-Associated Carcinogenesis', in. Humana Press, New York, NY, pp. 155–172. doi: 10.1007/978-1-4614-9227-6\_7.

Lee, Y.-J. *et al.* (2006) 'White Blood Cell Count and the Risk of Colon Cancer', *Yonsei Medical Journal*, 47(5), pp. 646–656. doi: 10.3349/ymj.2006.47.5.646.

Mantovani, A. *et al.* (2008) 'Cancer-related inflammation', *Nature*, 454(7203), pp. 436–444. doi: 10.1038/nature07205.

Maskens, A. P. (1976) 'Histogenesis and growth pattern of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma.', *Cancer research*, 36(5), pp. 1585–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/178424> (Accessed: 25 January 2019).

Matkowskyj, K. A. *et al.* (1999) 'Azoxymethane-induced fulminant hepatic failure in C57BL/6J mice: characterization of a new animal model', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277(2), pp. G455–G462. doi: 10.1152/ajpgi.1999.277.2.G455.

Miyoshi, N. *et al.* (2011) 'Chemoprevention of azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced mouse colon carcinogenesis by freeze-dried yam Sanyaku and its constituent diosgenin', *Cancer Prevention Research*, 4(6), pp. 924–934. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0279.

Moolgavkar, S. H. and Luebeck, E. G. (2003) 'Multistage carcinogenesis and the incidence of human cancer', *Genes, Chromosomes and Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, 38(4), pp. 302–306. doi: 10.1002/gcc.10264.

Moreno-Celis, U. *et al.* (2017) 'Phaseolus acutifolius Lectin Fractions Exhibit Apoptotic Effects on Colon Cancer: Preclinical Studies Using Dimethylhydrazine or Azoxi-Methane as Cancer Induction Agents', *Molecules*. Multidisciplinary Digital

Publishing Institute, 22(10), p. 1670. doi: 10.3390/molecules22101670.

Myung, Y.-J. *et al.* (2015) 'Effects of calcium on the formation of preneoplastic lesions in a mouse model of colon carcinogenesis', *Journal of the Preventive Veterinary Medicine*. The Korean Society of Preventive Veterinary Medicine, 39(1), pp. 15–22. doi: 10.13041/jpvm.2015.39.1.15.

Neufert, C., Becker, C. and Neurath, M. F. (2007) 'An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression', *Nature Protocols*, 2(8), pp. 1998–2004. doi: 10.1038/nprot.2007.279.

Parasuraman, S. (2011) 'Toxicological screening.', *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd., 2(2), pp. 74–9. doi: 10.4103/0976-500X.81895.

Pawson, T. and Bernstein, A. (1990) 'Receptor tyrosine kinases: genetic evidence for their role in Drosophila and mouse development', *Trends in Genetics*. Elsevier, 6(C), pp. 350–356. doi: 10.1016/0168-9525(90)90276-C.

Periasamy, S., Liu, C.-T., *et al.* (2015) 'Dietary Ziziphus jujuba Fruit Influence on Aberrant Crypt Formation and Blood Cells in Colitis-Associated Colorectal Cancer in Mice.', *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 16(17), pp. 7561–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26625762> (Accessed: 28 January 2019).

Periasamy, S., Liu, C. T., *et al.* (2015) 'Dietary Ziziphus jujuba fruit influence on aberrant crypt formation and blood cells in colitis-associated colorectal cancer mice', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(17), pp. 7561–7566. doi: 10.7314/APJCP.2015.16.17.7561.

Perše, M. and Cerar, A. (2012) 'Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Hindawi, 2012, pp. 1–13. doi: 10.1155/2012/718617.

Piñol Felis, C. (2001) 'Estudio de los cambios en la mucosa colónica de rata y cinética celular durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-Dimetilhidracina'. Universitat de Lleida. Available at: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=7238> (Accessed: 21 December 2018).

Piñols Felis, C. (1999) *Estudio de los cambios en la mucosa colónica de rata y cinética celular durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-Dimetilhidracina*. Universidad de Lleida. Available at: <http://www.cervantesvirtual.com/obra/estudio-de-los-cambios-en-la-mucosa-colonica-de-rata-y-cinetica-celular-durante-la-carcinogenesis-experimental-inducida-con-12dimetilhidracina--0/> (Accessed: 21 December 2018).

Rakel, D. (2017) *Integrative medicine*.

Reya, T. *et al.* (2001) 'Stem cells, cancer, and cancer stem cells', *Nature*, pp. 105–111. doi: 10.1038/35102167.

De Robertis, M. *et al.* (2011) 'The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies.', *Journal of carcinogenesis*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 10, p. 9. doi: 10.4103/1477-3163.78279.

Roncucci, L., Medline, A. and Bruce, W. R. (1991) 'Classification of aberrant crypt foci and microadenomas in human colon.', *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 1(1), pp. 57–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1845171> (Accessed: 16 February 2019).

Rosa, D. D. *et al.* (2015) 'Extract of the bark of *Bathysa cuspidata* attenuates the development of chemically-induced preneoplastic colorectal lesions in rats',

*Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(5), pp. 732–740. doi: 10.1590/S1516-89132015050228.

Sengottuvelan, M., Senthilkumar, R. and Nalini, N. (2006) 'Modulatory influence of dietary resveratrol during different phases of 1,2-dimethylhydrazine induced mucosal lipid-peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1760(8), pp. 1175–1183. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.03.008.

Shan, W. *et al.* (2007) 'Peroxisome proliferator-activated receptor- $\beta/\delta$  protects against chemically induced liver toxicity in mice', *Hepatology*, 47(1), pp. 225–235. doi: 10.1002/hep.21925.

Shwter, A. N. *et al.* (2014) 'Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci by *Gynura procumbens* in rats', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier Ireland Ltd, 151(3), pp. 1194–1201. doi: 10.1016/j.jep.2013.12.044.

Siu, I. M. *et al.* (1999) 'The identification of monoclonality in human aberrant crypt foci.', *Cancer research*, 59(1), pp. 63–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892186> (Accessed: 1 February 2019).

Stryker, S. J. *et al.* (1987) 'Natural history of untreated colonic polyps.', *Gastroenterology*, 93(5), pp. 1009–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3653628> (Accessed: 19 September 2018).

Sunter, J. P. and Senior, P. V. (1983) 'Induction of renal tumours in rats by the administration of 1,2 dimethylhydrazine', *The Journal of Pathology*. John Wiley & Sons, Ltd, 140(1), pp. 69–76. doi: 10.1002/path.1711400108.

Suzuki, R. *et al.* (2005) 'Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane.', *Histology and histopathology*, 20(2), pp. 483–92. doi: 10.14670/HH-20.483.

Tanaka, T. *et al.* (2001) 'Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats.', *Cancer research*, 61(6), pp. 2424–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11289109> (Accessed: 21 December 2018).

Tanaka, T. *et al.* (2008) 'Citrus compounds inhibit inflammation- and obesity-related colon carcinogenesis in mice', *Nutrition and Cancer*, 60(SUPPL. 1), pp. 70–80. doi: 10.1080/01635580802381253.

Tanaka, T. (2009) 'Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies', *Journal of Carcinogenesis*, 8(1), p. 5. doi: 10.4103/1477-3163.49014.

Tanaka, T. *et al.* (2009a) 'Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats', *Chemico-Biological Interactions*, 177(2), pp. 128–136. doi: 10.1016/j.cbi.2008.10.047.

Tanaka, T. *et al.* (2009b) 'Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats', *Chemico-Biological Interactions*. Elsevier, 177(2), pp. 128–136. doi: 10.1016/J.CBI.2008.10.047.

Terzić, J. *et al.* (2010) 'Inflammation and Colon Cancer', *Gastroenterology*, 138(6), p. 2101–2114.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.058.

Torroella Kourí, M. *et al.* (1998) *Bases genéticas del cáncer*. Inc. Available at: [https://books.google.com.mx/books/about/Bases\\_genéticas\\_del\\_cáncer.html?id=AqxOAAAACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.mx/books/about/Bases_genéticas_del_cáncer.html?id=AqxOAAAACAAJ&redir_esc=y) (Accessed: 18 September 2018).

Verghese, M. *et al.* (2002) 'Dietary Inulin Suppresses Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci and Colon Tumors at the Promotion Stage in Young Fisher 344 Rats', *The Journal of Nutrition*. Oxford University Press, 132(9), pp. 2809–2813. doi: 10.1093/jn/132.9.2809.

Yu, M. *et al.* (2018) 'Molecular structure of dextran sulphate sodium in aqueous environment', *Journal of Molecular Structure*. Elsevier, 1156, pp. 320–329. doi: 10.1016/J.MOLSTRUC.2017.11.090.

Ziliotto, L., Barbisan, L. F. and Rodrigues, M. (2008) 'Article Lack of chemoprevention of dietary *Agaricus blazei* against rat colonic aberrant crypt foci'. doi: 10.1177/0960327108091862.