

Effects of bile salts on the formation of mitotic aberrations in colon cells

Efectos de las sales biliares sobre la formación de aberraciones mitóticas en células de colon

Silvia Elizabeth Romero Barajas¹, Fernanda Jazmín Flores Lara¹, María Fernanda Domínguez Aceves², Karla Adriana Tejeda Torres², Rebeca Monroy Torres³, Mayra Montecillo Aguado⁴, Marco Antonio Hernández Luna⁴

¹ Estudiante del Departamento de Medicina y Nutrición, Universidad de Guanajuato, León, Gto., México.

² Estudiante de la División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., México

³ Jefa del Laboratorio de Nutrición Ambiental y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Guanajuato, Campus León.

⁴ Laboratorio de Biomedicina Traslacional del Departamento de Medicina y Nutrición, Universidad de Guanajuato, León, Gto., México.

elizabethromeroba@gmail.com¹, fj.floreslara@ugto.mx¹, mf.dominguezaceves@ugto.mx², ka.tejedatorres@ugto.mx², rmonroy@gmail.com³, mayramontecillo@gmail.com⁴, marco.hernandez@ugto.mx⁴

Resumen

Introducción: El cáncer colorrectal es una de las neoplasias más comunes en todo el mundo con una alta tasa de incidencia y mortalidad. El desarrollo de este tipo de tumor se ha asociado a múltiples causas, incluyendo el tipo de alimentación. Las sales biliares secundarias, producto del metabolismo bacteriano del intestino grueso, participan como mediadores en el proceso de la carcinogénesis en el colon. Por otra parte, las infecciones ocasionadas por bacterias patógenas incluyendo *Salmonella typhimurium* se han asociado con el desarrollo de múltiples trastornos crónicos como el Síndrome de intestino irritable y Enfermedad intestinal inflamatoria, ambas enfermedades asociadas al cáncer colorrectal.

Objetivo: Determinar si la exposición de las células HT-29, un modelo de células de cáncer de colon humano, a sales biliares e infectadas con *Salmonella typhimurium*, presentan un incremento en el número de mitosis aberrantes en comparación con células no infectadas.

Métodos: Se utilizó una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano (HT-29). Las células se expusieron a diferentes concentraciones de sales biliares por distintos periodos de tiempo 24, 48 y 72 horas. Posteriormente, las células se infectaron con *Salmonella typhimurium* ATCC 14028TM. Después de la infección, se las células se tiñeron con hematoxilina-eosina y se evaluó el índice mitótico y la formación de figuras mitóticas aberrantes mediante microscopía de campo claro.

Resultados: Los resultados muestran diferencias en la presencia de mitosis aberrantes entre las células infectadas y las no infectadas, tratadas con sales biliares.

Conclusiones: La inestabilidad genómica y la carcinogénesis están influenciadas por distintos factores presentes en el lumen intestinal. El impacto de las dietas sobre el incremento de las sales biliares en el colon y la infección concomitante de *Salmonella typhimurium* son algunos de ellos.

Palabras clave: cáncer colorrectal, sales biliares, *Salmonella typhimurium*.

Introducción

Las neoplasias malignas son la principal causa de muerte a nivel mundial; en el 2020 se le atribuyeron alrededor de 10 millones de defunciones a este grupo de enfermedades. Según la OMS, el cáncer colorrectal (CCR) ocupó el tercer lugar en 2022 como uno de los cánceres más comunes con una incidencia de 1,926,425 casos, solo después del cáncer de mama y de pulmón; además, de ocupar el segundo lugar en 2022 como una de las principales causas de muerte por neoplasias malignas con 904,019 defunciones en todo el mundo (Figura 1) (Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), n.d.; International Agency for Research on Cancer. (s.f.), 2024).

En México, según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en el 2022 se reportaron que los tumores malignos de colon, recto y del ano, ocuparon el primer lugar en mortalidad en hombres de 30 a 59 años, y el cuarto lugar en mujeres con el mismo rango de edad, con una tasa de mortalidad de 5.86 y 4.05 respectivamente (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2024). Así mismo, datos del *Institute for Health Metrics and Evaluation*: GBD Compare de 1990 a 2021 mostraron un aumento en las tasas de

mortalidad de cáncer de colon y recto en México en personas de 15 a 49 años, (Figura 2) (Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), n.d.). Por otra parte, se ha reportado que los países de altos ingresos muestran las tasas de incidencias más altas, en comparación con los países de bajos ingresos que tienen las tasas más bajas. Esto puede estar relacionado con factores como el tipo de dieta (Pinheiro et al., 2024a; Saus et al., 2019).

La incidencia del CCR ha aumentado en todo el mundo, especialmente en Occidente, y desafortunadamente el aumento se ha dado especialmente en adultos jóvenes. Este tipo de neoplasias representan un problema de salud pública, por lo que se requieren de medidas preventivas, diagnósticas y de tratamiento eficientes, que hasta el día de hoy continúan en constante mejora e investigación (Pinheiro et al., 2024b).

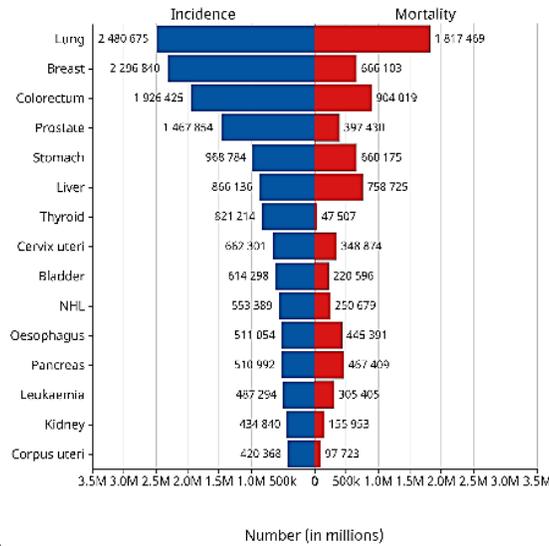
Aunque existen múltiples factores asociados al desarrollo del CCR, las etiologías que se han relacionado de forma predominante son principalmente el estilo de vida, y solo el 5% de los casos están asociadas a factores hereditarios y otras alteraciones genéticas. La mitad de los pacientes que desarrolla cáncer de colon durante el curso de la enfermedad desarrollan metástasis, la mayoría de estas incurables (Pinheiro et al., 2024a).

Por otra parte, el consumo de una dieta alta en grasas y bajas en fibras se asocia directamente con una mayor incidencia de CCR. Las variaciones en el estilo de vida, condiciones fisiológicas, genéticas y ambientales son determinantes de los niveles de ácidos biliares en cada persona. Los ácidos biliares son componentes esenciales en la emulsificación de los diferentes tipos de lípidos que se consumen con la dieta, y regulan la homeostasis del epitelio del tracto gastrointestinal. Las dietas altas en grasas aumentan los niveles de ácidos biliares en el colon, principalmente ácidos biliares secundarios, que tienen un papel importante en la inducción de células tumorales o promotoras de tumores, generando inestabilidad genómica y daño en el ADN. Estos ácidos biliares secundarios, producto del metabolismo de la microbiota intestinal, influyen en los mecanismos de señalización intracelular y desestabilizan las membranas celulares, dando lugar a un aumento en la proliferación celular (Režen et al., 2022).

Adicionalmente, otro factor que se ha asociado a las neoplasias del tracto gastrointestinal, incluido el cáncer colorrectal, es la presencia de bacterias patogénicas, cuyas proteínas regulan las células epiteliales e inmunológicas para amortiguar la respuesta inflamatoria, lo que ayuda a las bacterias a sobrevivir y mantener la inflamación crónica. Un aspecto común del cáncer relacionado con infecciones es la inducción de inflamación crónica (Martin et al., 2019; Sun, 2022). Se ha demostrado que la microbiota de los pacientes con CCR alberga una mayor proporción de bacterias que expresan genotoxinas; su efecto protumorigénico se ha demostrado en modelos murinos, con predisposición a desarrollar cáncer o displasia (Sun, 2022). En un modelo *in vivo* se observó que la infección recurrente con *Salmonella (S.) enterica* resulta en una disminución progresiva de la inflamación intestinal, a través del envejecimiento molecular acelerado de una enzima protectora del huésped (Sun, 2022). La salmonelosis causada principalmente por sus serotipos *S. typhimurium* y *S. Enteritidis*, se han visto implicadas en el desarrollo de varias secuelas crónicas, incluido el Síndrome de intestino irritable y Enfermedad intestinal inflamatoria (Sun, 2022).

Con base a estos antecedentes, el objetivo principal de este estudio fue determinar si la exposición de las células HT-29 (un modelo de células de cáncer de colon humano), a sales biliares e infectadas con *Salmonella typhimurium*, presentan un incremento en el número de mitosis aberrantes en comparación con células no infectadas. Esta investigación permitirá entender mejor los mecanismos de interacción entre *Salmonella* y las células epiteliales de cáncer de colon, así como sus posibles implicaciones en la patogénesis de infecciones bacterianas en presencia de concentraciones altas de sales biliares.

Absolute numbers, Incidence and Mortality, Both sexes, in 2022
World
(Top 15 cancer sites)



Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>
Data version : Glinhocan 2022 (version 1.1)
© All Rights Reserved 2024

International Agency
for Research on Cancer
World Health
Organization

Figura 1. Incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cáncer para ambos sexos a nivel mundial. Gráfica obtenida de International Agency for Research on Cancer. (Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), n.d.; International Agency for Research on Cancer. (s.f.), 2024)

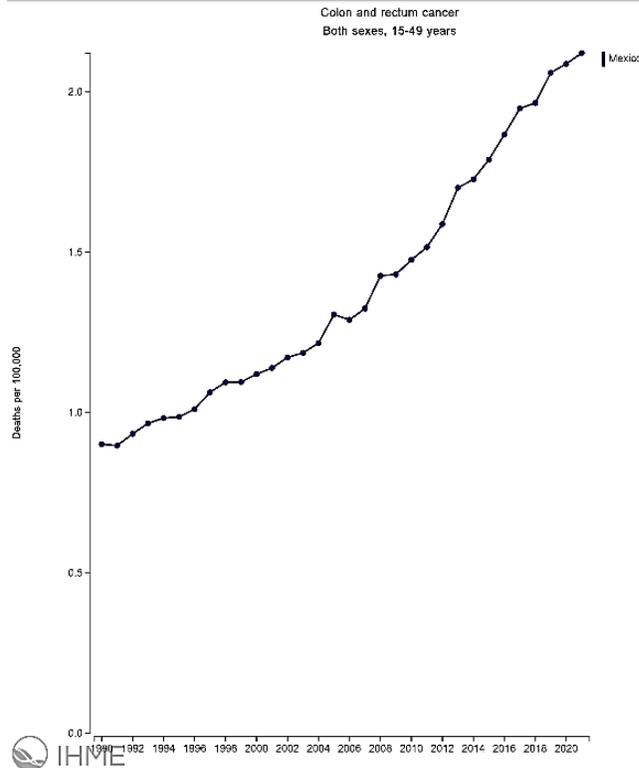


Figura 2. Incidencia de cáncer colorrectal en ambos sexos en individuos de entre 15 a 49 años en México. Gráfica obtenida de Institute for Health Metrics and Evaluation. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), n.d.).

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Este estudio experimental y comparativo.

Cepas bacterianas y líneas celulares

El efecto de las sales biliares y la infección con *Salmonella typhimurium* se evaluó utilizando células de la línea celular HT-29 (adenocarcinoma colorrectal humano) y la cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* ATCC 1408. Ambas cepas se encuentran disponibles en el laboratorio de Biomedicina Traslacional del Campus León de la Universidad de Guanajuato.

Exposición a las sales biliares e infección de células HT-29

Se cultivaron 1×10^4 células HT-29 en láminas Labtech, se utilizó medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) para inducir el crecimiento celular, estas a su vez se suplementaron con dos tipos de sales biliares, que son el colato de sodio una sal biliar primaria; desoxicolato de sodio, sal biliar secundaria; y la combinación de ambas sales a concentraciones de 100, 200 y 400 μM . Las células se incubaron por 24, 48 y 72 horas a una temperatura de 37° C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Después de tratar las células con las sales biliares a distintos tiempos, las células fueron infectadas con *S. typhimurium* durante 30 minutos con una MOI de 100. Posteriormente, las células se lavaron e incubaron por una hora con DMEM suplementado con gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para eliminar las bacterias que no infectaron. Por último, las células se fijaron con metanol frío durante 10 minutos, y se dejaron secar.

Índice mitótico y formación de figuras mitóticas aberrantes

Para la evaluación del índice mitótico, las células se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Brevemente, para realizar la tinción, las células se hidrataron con agua destilada, después las laminillas se sumergieron en hematoxilina durante dos minutos, seguido de un lavado en agua para retirar el excedente del colorante. Después se realizaron cinco lavados en etanol-HCL, y treinta lavados en etanol al 70% dos veces, se sumergieron durante tres minutos y medio en eosina y, por último, se deshidrataron con treinta baños de etanol al 96%, y 100%. Finalmente, se hicieron 30 baños en xilol dos veces. El portaobjetos se cubrió con resina, se le colocó un cubreobjetos y se dejó secar durante 24 horas.

Una vez que las laminillas estuvieron listas, estas se observaron en un microscopio de campo claro, donde se tomaron 10 campos de 100 células de forma aleatoria en cada una de las diferentes condiciones y se contó: a) el índice mitótico; b) el % de células binucleadas; y c) el % de células con micronúcleo. Para cada condición cuantificada se usaron las siguientes formulas: a) Índice mitótico = Número de mitosis/100; b) Células binucleadas: número de células binucleadas/100 células; c) Células con micronúcleo: número de células con micronúcleo/100 células. Para el caso de las metafases aberrantes se puntuaron 300 figuras de mitosis en cada grupo experimental y se determinó el porcentaje de metafases aberrantes, a través de la siguiente formula: % Metafases aberrantes: número de metafases/100 mitosis.

Las laminillas fueron fotografiadas con un objetivo de 20X, utilizando un microscopio de campo claro, con una cámara AmScope 500 de 5.0 M píxeles empleando el software MD500.

Resultados

Número de células HT-29 en mitosis después de la exposición a sales biliares y la infección de *Salmonella typhimurium*

Para la determinación del efecto de las sales biliares en el proceso mitótico de la línea celular HT-29 y su sinergia con la infección de *S. typhimurium*, expuestas a concentraciones de 100, 200 y 400 μM de dos tipos de sales biliares, que son el colato y desoxicolato de sodio.

Mitosis totales en células HT-29

Los resultados obtenidos muestran una disminución de las células en mitosis tras su exposición a sales biliares primarias y secundarias a distintas concentraciones y periodos de tiempo, en comparación con el control (medio DMEM).

En la Figura 3 se observa que, después de 24 horas de exposición, las células tratadas con 100 y 200 μM de sales biliares presentan una disminución significativa en el número de mitosis totales en comparación con el grupo control. Este efecto es aún más pronunciado a las 48 horas, especialmente en la concentración de 400, donde prácticamente no se observan células en mitosis.

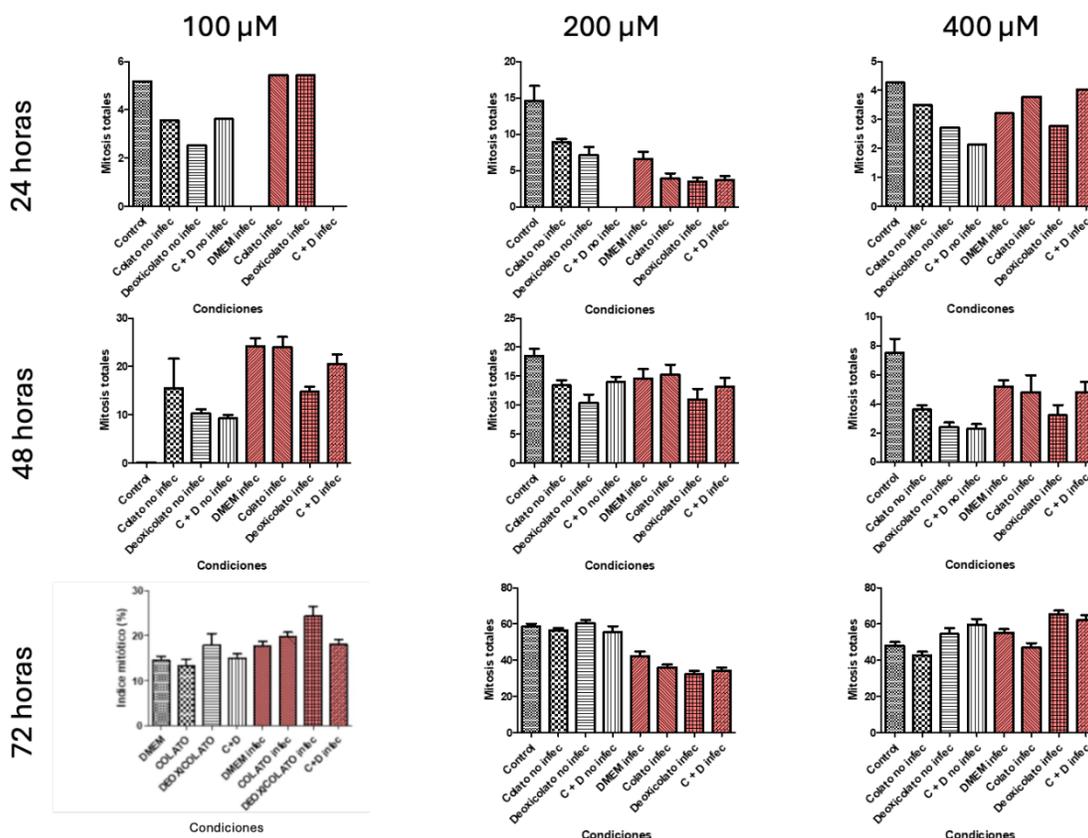


Figura 3. Conteo de mitosis totales de la línea celular HT-29 a tiempos de 24, 48, 72 horas a una concentración de DMEM (control), colato, deoxicolato y combinación de colato y deoxicolato de 100, 200 y 400 μM .

Células binucleadas HT-29 por la exposición a sales biliares y la infección de *Salmonella typhimurium*

La Figura 4 ilustra el número de células binucleadas después del tratamiento con diferentes concentraciones de sales biliares y la infección con *Salmonella typhimurium*. Se observa un aumento significativo en el número de células binucleadas en algunas de las concentraciones y tiempos evaluados. Este efecto es particularmente notable a la concentración de 200 μM a 48 horas y 400 μM a 24 y 48 horas de tratamiento. Así mismo, se muestra una marcada diferencia entre las células infectadas y las no infectadas tratadas a 200 μM de deoxicolato.

En contraste, las células tratadas a 400 μM por 24 horas muestran similitud con las células no tratadas. Por otro lado, se observa una discrepancia mayor en la incidencia de células binucleadas en las células expuestas a las diferentes sales biliares y el control DMEM en conjunto con la infección con *S. typhimurium* a una concentración de 100 μM a un tiempo de 72 horas que en todas las demás condiciones presentadas.

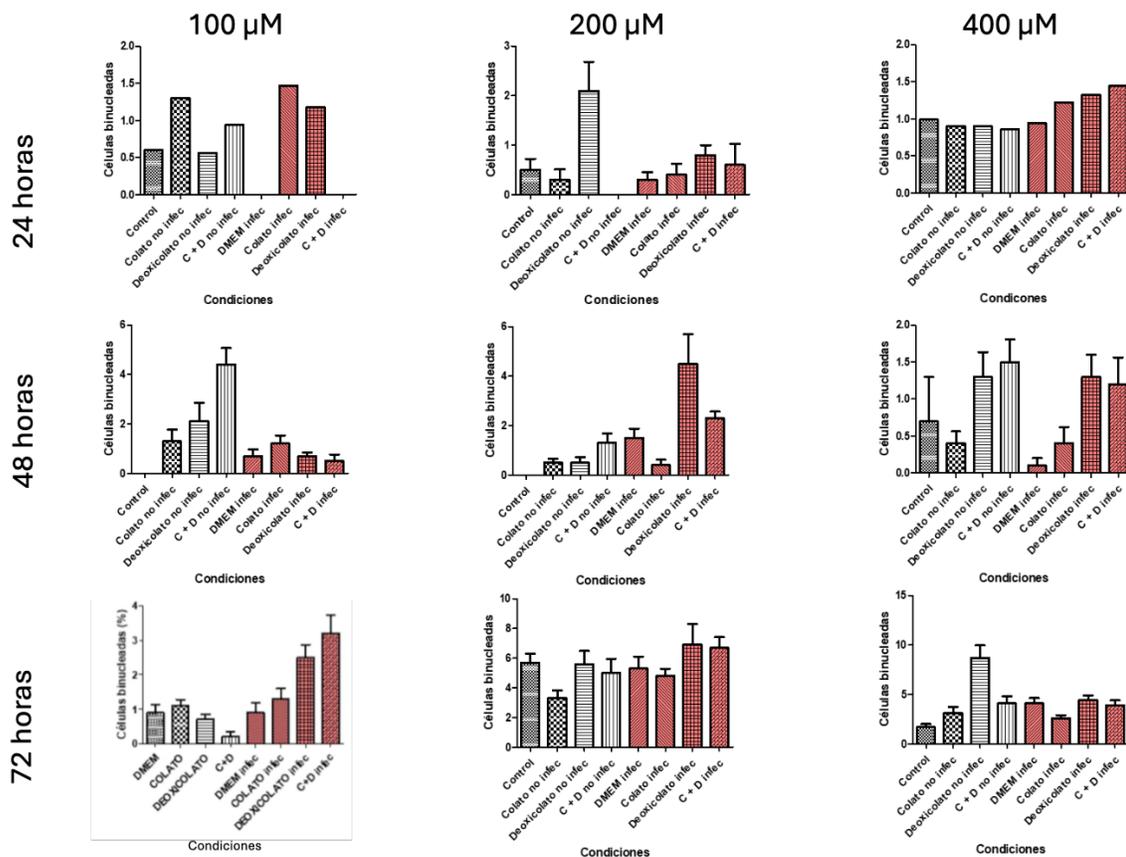


Figura 4. Conteo de células binucleadas de células HT-29 expuestas a 24, 48 y 72 horas con concentraciones de 100, 200 y 400 µM de colato, desoxicolato y combinación de ambas sales e infectadas con *Salmonella*.

Micronúcleos en células HT-29 expuestas a sales biliares e infección de *Salmonella typhimurium*

La formación de micronúcleos, como se muestra en la Figura 5, aumenta significativamente en las células HT-29 tratadas con sales biliares e infectadas con *S. typhimurium*. Las células que muestran un mayor contraste entre infectadas y las no infectadas son las que fueron tratadas con 200 y 400µM a 48 horas. Esto indica que la proliferación de células con micronúcleos en la línea celular HT-29 se ve favorecida en un medio con concentraciones superiores a las de 200 µM de las sales biliares y que, además, se encuentren en presencia de una infección por *S. typhimurium* en un lapso de 48 horas.

Por otro lado, las células tratadas a 400 µM por 72 horas demuestran que los micronúcleos se presentan en un ambiente favorecido por la presencia de colato principalmente, seguido del desoxicolato y finalmente la combinación de ambas sales biliares.

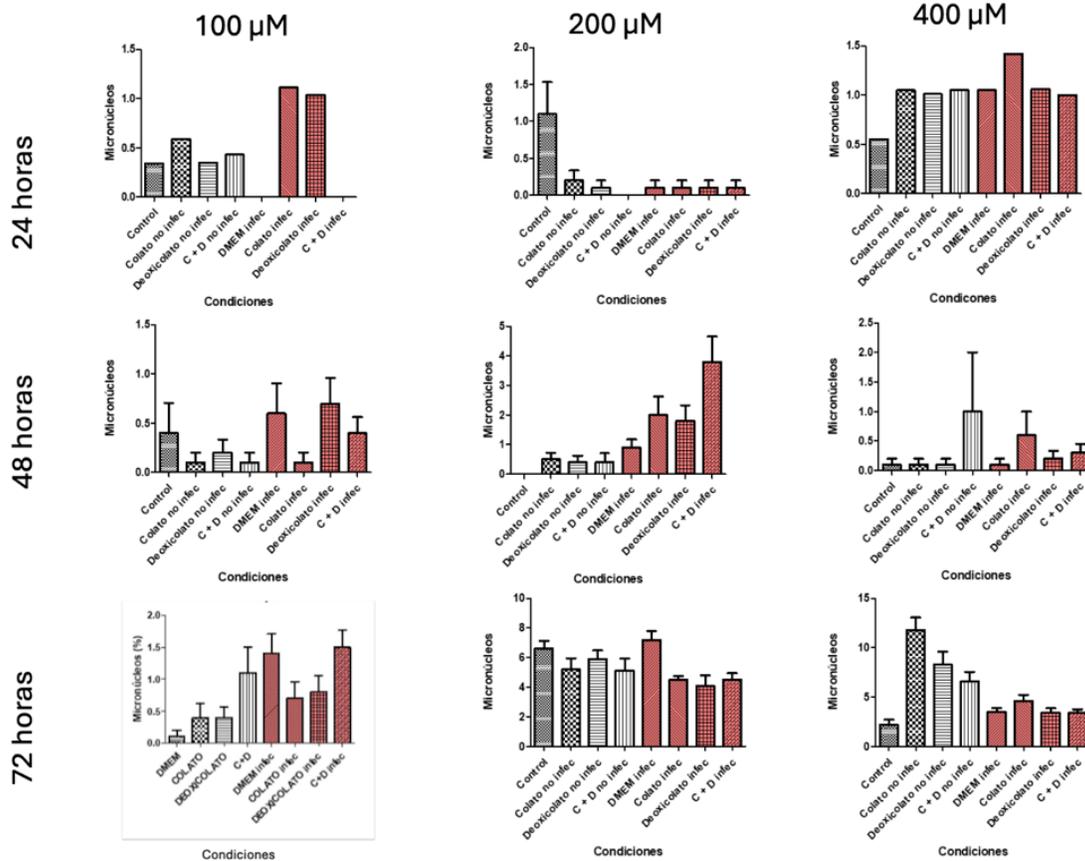


Figura 5. Conteo de la línea celular HT-29 de células con micronucleos a tiempos de 24, 48 y 72 horas a una concentración de DMEM (control), colato, desoxicolato y combinación de colato y desoxicolato de 100, 200 y 400 μM.

Metafases aberrantes en células HT-29 expuestas a sales biliares e infección de *Salmonella typhimurium*

En la Figura 6, se muestra el número de metafases aberrantes en células tratadas. Los resultados demuestran un aumento significativo en las metafases aberrantes en algunos los tratamientos en comparación con el control, especialmente a concentraciones de 100 y 400 μM después de 48 horas. En estos resultados se puede evidenciar que la infección con *Salmonella typhimurium* promueven la proliferación de metafases aberrantes en las diferentes concentraciones de colato y desoxicolato de sodio con las que se trataron las células HT-29. Por otro lado, se aprecia que incluso en las células que no fueron expuestas a la infección por *S. typhimurium*, muestran un aumento de la generación de metafases aberrantes cuando se exponen a concentraciones de 100, 200 y 400 μM en un tiempo de 72 horas.

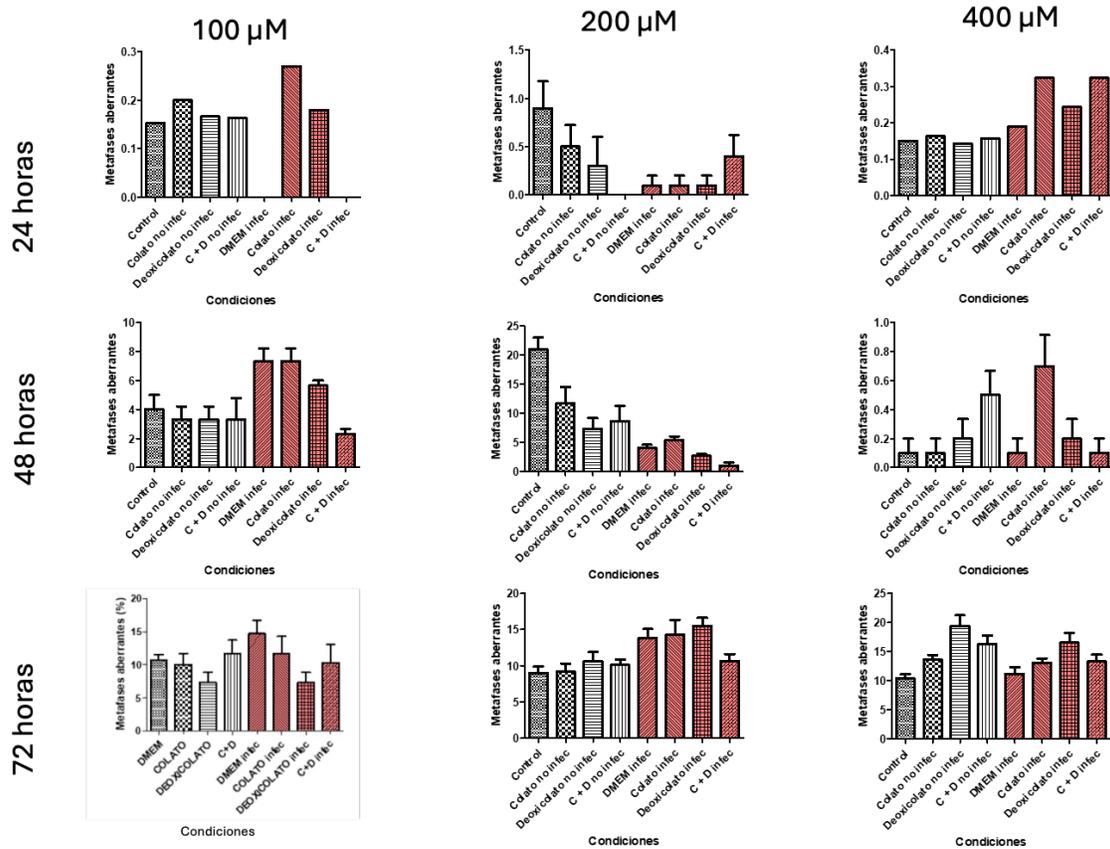


Figura 6. Células HT-29 con metafases aberrantes después de la exposición por 24, 48 y 72 horas a diferentes concentraciones de 100, 200 y 400 µM de colato, desoxicolato y combinación de ambas sales, e infectadas con Salmonella. El control corresponde a células HT-29 en medio DMEM.

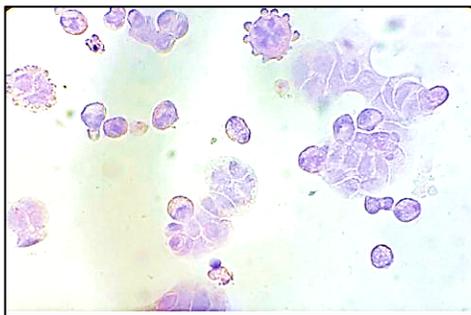


Figura 7.- Células infectadas a 100 µM por 48 horas, medio DMEM control.

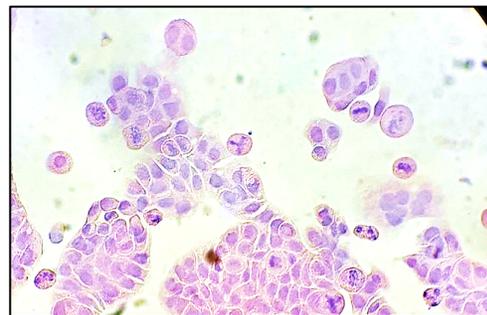


Figura 8.- Células infectadas a 100 µM a 48 horas, medio colato.

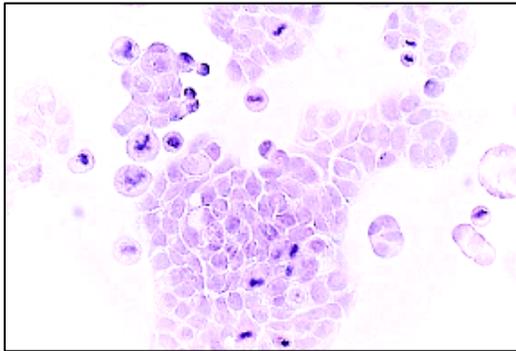


Figura 9. Células infectadas 200 μ M, 48 horas. DMEM. se observan múltiples aberraciones mitóticas.

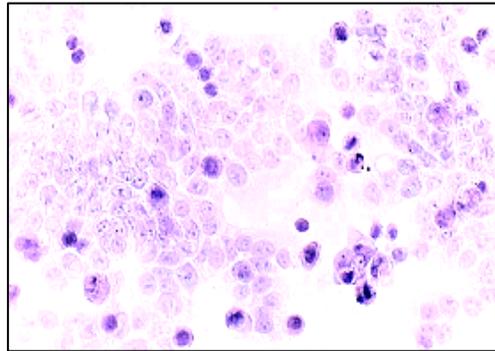


Figura 10. Células infectadas. 200 μ M a 48 horas. Colato

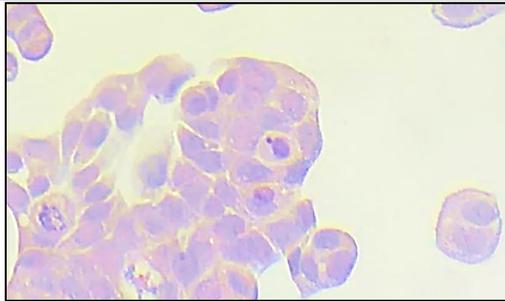


Figura 11. Células infectadas, 200 μ M, 48 horas. Desoxicolato. Se observa una célula con un micronúcleo.

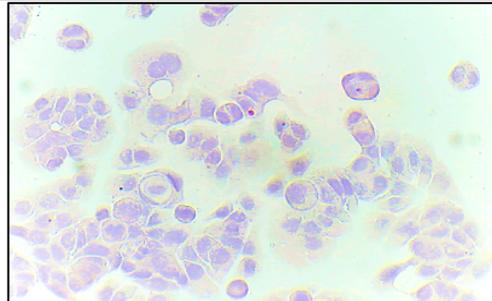


Figura 12. Células infectadas. 200 μ M, 48 horas. Colato+desoxicolato.

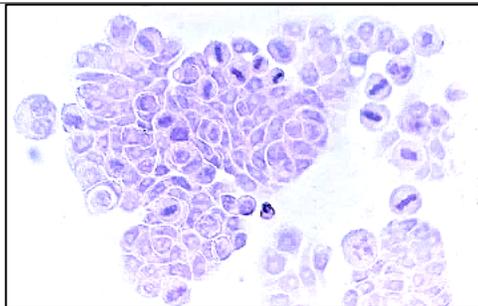


Figura 13.-. Células no infectadas, 200 μ M 72 horas, medio DMEM control.

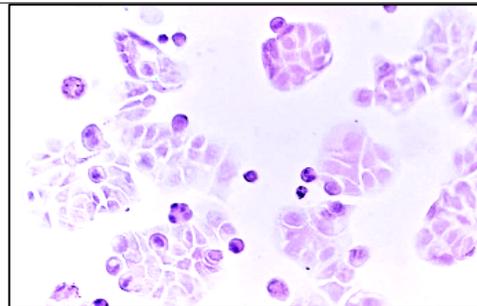


Figura 14.- Células infectadas, 200 μ M 72 horas, medio DMEM control.

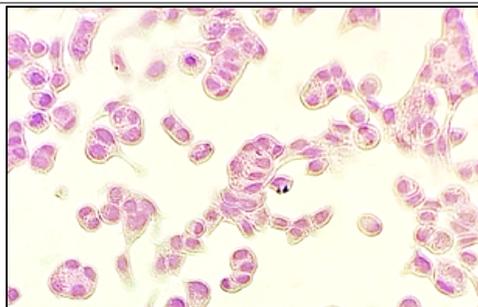


Figura 15. Células no infectadas 400 μ M 72 horas, medio Deoxicolato de sodio.

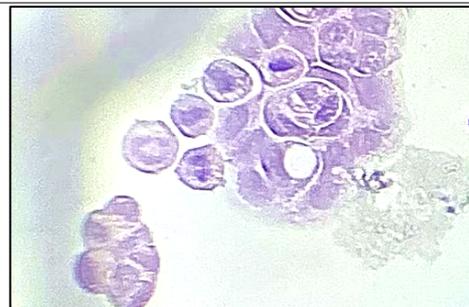


Figura 16. Células no infectadas 400 μ M a 72 horas. Se observan 2 metafases aberrantes.

Discusión

El tubo digestivo se caracteriza por participar en la homeostasis del organismo a través de la absorción de alimentos, respuestas inmunitarias, secreción de sustancias endócrinas, entre otras. Las interacciones de la mucosa intestinal con los componentes normales del lumen y con microorganismos patógenos, es una diana de investigación en la carcinogénesis del CCR (Hanus et al., 2021; Saus et al., 2019).

En este estudio mostramos evidencia de que las sales biliares tienen un efecto negativo significativo sobre la división celular normal en las células de adenocarcinoma colorrectal humano (HT-29). La exposición a estas sales, en combinación con la infección con *S. typhimurium*, no solo disminuye o aumenta la cantidad de células en mitosis, sino que también aumenta la formación de células binucleadas, células con micronúcleos y metafases aberrantes.

Estos resultados sugieren que los ácidos biliares, especialmente en altas concentraciones, pueden inducir daños significativos al ADN y la división celular, promoviendo así la inestabilidad genómica y posiblemente el desarrollo de cáncer. Además, la presencia de *S. typhimurium* parece potenciar los efectos negativos, resaltando la importancia de las infecciones con bacterias enteropatógenas y su impacto sobre la microbiota intestinal en la carcinogénesis del cáncer colorrectal.

En cuanto a las metafases aberrantes, se observa un aumento en este número de células tras la exposición a las sales biliares y la infección con *S. typhimurium*, exceptuando aquellas expuestas a la concentración de 200 μM a distintos tiempos. Sobre las células binucleadas, podemos observar un aumento después del tratamiento con sales biliares y *S. typhimurium*. Respecto a los micronúcleos, observamos un aumento significativo tras ser sometidos al tratamiento con sales biliares, siendo más notable en este aumento en las células que además fueron infectadas con *S. typhimurium*, sin embargo, las únicas que no mostraron este aumento son las sometidas a una concentración de 200 μM a 24 horas.

Nuestros resultados muestran que la exposición a distintas concentraciones de sales biliares y por distintos periodos de tiempo, disminuyen el número de células en mitosis en comparación con el control (DMEM).

Por otra parte, la microbiota intestinal, compuesta predominantemente por Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacterias. (Hanus et al., 2021; Tabowei et al., 2022), es influenciada desde el nacimiento, el estilo de vida, la dieta, la edad, entre otros factores; sin embargo, existe un consenso en el que se define al microbioma intestinal saludable como aquel que pasa por un estado de equilibrio estable y resistente con una alta diversidad de especies. Este es un dato interesante porque uno de los aspectos más perjudiciales de una dieta alta en grasas es la presencia de una concentración aumentada de ácidos biliares hidrofóbicos en el colon (Payne et al., 2010), incluso se ha reportado niveles elevados en la materia fecal de las poblaciones con alta incidencia de CCR (Režen et al., 2022; Saus et al., 2019).

Estudios previos han demostrado que el ácido quenodesoxicólico (COD), un ácido biliar hidrofóbico importante en el colon de los seres humanos en una dieta alta en grasas causa la interrupción de la mitosis, lo que posiblemente conlleva a aneuploidía, un factor importante para la carcinogénesis. (Payne et al., 2010) Nuestro trabajo, demuestra que las células tras someterse a distintas concentraciones de sales biliares disminuyen el número de células en mitosis, comparada con las que no recibieron tratamiento de sales biliares (Figura 3).

Así mismo, se ha demostrado que altas concentraciones de sales biliares como el COD, inducen la formación de micronúcleos, tanto en células cancerosas como no cancerosas (Payne et al., 2010). Nuestros resultados, muestran que tras la exposición de sales biliares como colato y desoxicolato, aumentó el número de micronúcleos en las células HT-29 (Figura 5). Los micronúcleos suelen formarse por factores que provocan la pérdida de material genético, tales como sustancias genotóxicas, errores en la replicación, roturas cromosómicas, radiación entre otros factores, que pueden ser el origen de mutaciones y cáncer. (Payne et al., 2010; Tabora et al., 2016; Torres y Arias, 2023)

Las células binucleadas (con dos núcleos dentro de las células), pueden ser otro indicativo de anomalías cromosómicas y citotoxicidad (Torres y Ramos, 2013; Flores y Yamaguchi, 2008). Otros estudios, reportaron un aumento de hasta el 80% en el número de células binucleadas de la línea celular HT-29 después de 24 horas del tratamiento con ácido quenodesoxicólico y citocalasina B, esto con respecto a las células que no fueron tratadas (Payne et al., 2010). Nuestro trabajo, respaldaría la hipótesis de que una alta concentración de sales biliares aumenta la cantidad de anomalías cromosómicas y citotoxicidad como las células binucleadas con un incremento notable en su conteo bajo las distintas condiciones de exposición a sales biliares y en conjunto con la infección de *S. typhimurium* (Figura 4).

Además, un estudio hecho por Payne y col., demostró que la exposición a corto o largo plazo de las células epiteliales de colon a altas concentraciones de DOC desencadenó el aumento significativo de figuras mitóticas aberrantes, incluyendo las metafases respecto al control (Payne et al., 2010). De forma consistente, los resultados de nuestra investigación reflejaron un aumento significativo en el total de metafases aberrantes en las células de la línea HT-29 después de recibir el tratamiento con colato y desoxicolato bajo distintas condiciones de concentración y periodos de tiempo (Figura 6).

Conclusiones

Con base a nuestros resultados, se concluye que una dieta rica en grasas y fructosa aumenta la concentración de ácidos biliares en el colon, que junto con infecciones bacterianas como las causadas por *S. typhimurium*, pueden ser factores importantes en la promoción de la inestabilidad genómica y el desarrollo de cáncer colorrectal, provocando alteraciones en todo el proceso mitótico generando células binucleadas, con micronúcleos y metafases aberrantes.

Del mismo modo, se establece que la infección por *S. typhimurium* disminuye el proceso de mitosis normales y potencializa la producción de células binucleadas, células con micronúcleos y metafases aberrantes en la mayoría de los ensayos realizados, sugiriendo un incremento de la inestabilidad genómica que puede predisponer al desarrollo de CCR. Finalmente, en esta investigación se resalta la importancia y participación de estos dos factores como posibles agentes promotores del desarrollo de cáncer en el colon.

Referencias

1. Flores, M., & Yamaguchi, M. U. (2008). Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. *Saúde e Pesquisa*, 1(3), 337-340.
2. Hanus, M., Parada-Venegas, D., Landskron, G., Wielandt, A. M., Hurtado, C., Alvarez, K., Hermoso, M. A., López-Köstner, F., & De la Fuente, M. (2021). Immune System, Microbiota, and Microbial Metabolites: The Unresolved Triad in Colorectal Cancer Microenvironment. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.612826>
3. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). (n.d.). "GBD Compare | Viz Hub." Internet. Retrieved July 13, 2024, from <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>
4. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2024, February 2). *A propósito del Día Mundial contra el Cáncer*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2024/EAP_CANCER24.pdf.
5. International Agency for Research on Cancer. (s.f.). (2024). *Cancer Today: Data Visualization Tools*. Globocan 2022. https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/bars?mode=cancer&key=total&group_populations=1&types=0_1&sort_by=value1&populations=900&multiple_populations=0&values_position=out&cancers_h=8
6. Martin, O. C. B., Bergonzini, A., D'Amico, F., Chen, P., Shay, J. W., Dupuy, J., Svensson, M., Masucci, M. G., & Frisan, T. (2019). Infection with genotoxin-producing *Salmonella enterica* synergises with loss of the tumour suppressor APC in promoting genomic instability via the PI3K pathway in colonic epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 21(12). <https://doi.org/10.1111/cmi.13099>
7. Payne, C. M., Crowley-Skillicorn, C., Bernstein, C., Holubec, H., Moyer, M. P., & Bernstein, H. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: Relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, 62(6), 825–840. <https://doi.org/10.1080/01635581003695756>
8. Pinheiro, M., Moreira, D. N., & Ghidini, M. (2024a). Colon and rectal cancer: An emergent public health problem. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 30, Issue 7, pp. 644–651). Baishideng Publishing Group Inc. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i7.644>
9. Pinheiro, M., Moreira, D. N., & Ghidini, M. (2024b). Colon and rectal cancer: An emergent public health problem. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 30, Issue 7, pp. 644–651). Baishideng Publishing Group Inc. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i7.644>
10. Režen, T., Rozman, D., Kovács, T., Kovács, P., Sipos, A., Bai, P., & Mikó, E. (2022). The role of bile acids in carcinogenesis. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 79, Issue 5). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04278-2>
11. Saus, E., Iraola-Guzmán, S., Willis, J. R., Brunet-Vega, A., & Gabaldón, T. (2019). Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 69, pp. 93–106). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.05.001>

12. Sun, J. (2022). Impact of bacterial infection and intestinal microbiome on colorectal cancer development. In *Chinese Medical Journal* (Vol. 135, Issue 4, pp. 400–408). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001979>
13. Taborga, X., Quispe, R., Larrea, M., Farfán, P., & Revollo, S. (2016). Presencia de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa oral en personas expuestas a agentes genotóxicos. *Revista CON-CIENCIA*, 4(2), 35-44. Recuperado en 25 de julio de 2024, de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652016000200004&lng=es&tlng=es.
14. Tabowei, G., Gaddipati, G. N., Mukhtar, M., Alzubaidee, M. J., Dwarampudi, R. S., Mathew, S., Bichenapally, S., Khachatryan, V., Muazzam, A., Hamal, C., Velugoti, L. S. D. R., & Mohammed, L. (2022). Microbiota Dysbiosis a Cause of Colorectal Cancer or Not? A Systematic Review. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.30893>
15. Torres, O. & Arias, L. (2023). Micronúcleos: Actualización del papel en la inestabilidad genética, inflamación, envejecimiento y cáncer. Revisión panorámica. *Revista Biomédica*, 34(2), 208-223.
16. Torres, O., & Ramos, M. (2013). Utilidad de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *International Journal of Morphology*, 31(2), 650-657.