

Reconstrucción óptica tridimensional de la mucosa murina con resolución celular. Utilidad para la evaluación del cáncer colorrectal

L. Erbes, L. Peretti, C. Galetto, M.F. Izaguirre y J. Adur

Autoras/es: Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LMAE). Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos. Ruta provincial 11, km 10 Oro Verde, Entre Ríos, Argentina
Contacto: javier.adur@uner.edu.ar

ARK: <https://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/gfmx89kal>

RESUMEN

En este trabajo presentamos los resultados obtenidos sobre un modelo murino de cáncer color rectal sobre el cual se aplicaron diferentes técnicas de microscopía y procesamiento y reconstrucción de imágenes. En cada punto experimental del modelo, utilizando microscopía laser confocal y microscopía del tiempo de vida de la fluorescencia, se buscó relacionar cambios morfológicos y metabólicos con el desarrollo de la patología.

La mucosa del colon fue seccionada ópticamente, logrando obtener reconstrucciones tridimensionales con espesores de entre 50 a 70 [µm]. Utilizando clarificantes, se intentó lograr mejores espesores de reconstrucción, pero el protocolo no pudo aplicarse sobre los tejidos patológicos.

Los resultados alcanzados demuestran que es posible obtener parámetros cuantitativos que sean indicadores de la etapa temprana de inicio de la patología. Lo cual abre posibilidades para su utilización para la evaluación del cáncer colorrectal.

Palabras clave: microscopia, mucosa colónica, cáncer colorrectal, cuantificación tridimensional

Objetivos propuestos y cumplidos

Los objetivos propuestos para este proyecto fueron:

- Desarrollar, implementar y validar una metodología para visualizar, registrar y cuantificar variables tisulares, celulares y subcelulares, de la mucosa completa del colon de ratón.
- Implementar un protocolo de transparentización de la mucosa del colon, utilizando agentes clarificantes, para incrementar la resolución de las estructuras en profundidad.
- Diseñar e implementar un protocolo de registro para capturar la mucosa completa del colon utilizando microscopia láser confocal.
- Establecer datos cuantitativos de variables morfológicas y moleculares, que posibiliten identificar en los volúmenes completos de la mucosa del colon, los diferentes estadios de la patología tumoral.

Los objetivos planteados fueron cumplidos prácticamente en su totalidad, dado que pudimos implementar una metodología para cuantificar la mucosa del colon en tres dimensiones. Dicha cuantificación fue realizada sobre la mucosa del colon normal y en distintos puntos de avance de la patología. Se lograron establecer datos cuantitativos que permitieron identificar los estadios tempranos de la patología. Se trabajó con diferentes técnicas de microscopía y protocolos de cuantificación y visualización tridimensional. Los protocolos de clarificación no funcionaron correctamente, sobre todo en las muestras patológicas, por lo que no se pudo trabajar con la mucosa completa.

INTRODUCCION

El cáncer colorrectal constituye la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo [1], escalando a la tercera posición en nuestro país [2]. Por este motivo, disponer de nuevas herramientas que permitan un diagnóstico temprano, resulta prioritario para controlar la mortalidad y morbilidad de la enfermedad.

Entre diferentes herramientas de diagnóstico temprano, varias técnicas de microscopia se están posicionando como alternativas mínimamente invasivas, de evaluación rápida, relativamente económicas y de alto valor diagnóstico [3-7]. Entre los métodos de microscopia se pueden citar, la detección de fluorescencia endógena tisular o autofluorescencia [8, 9] por desconvolución digital o microscopia láser confocal. Y las técnicas de óptica no lineal que permiten analizar la alteración estructural del tejido sin necesidad de marcar el mismo [6, 7]. De igual importancia, es el diseño de modelos experimentales que permitan seguir la evolución de diversas variables moleculares del cáncer colorrectal *in vitro* e *in vivo*. Por ello, es cada vez más importante registrar microscópicamente e interpretar efectos producidos en la progresión del cáncer y metástasis, tales como cambios de arquitectura y el patrón de señales fluorescentes.

La visualización microscópica del intestino en condiciones normales y patológicas es esencial para comprender la fisiología y desarrollar herramientas de detección y diagnóstico para enfermedades intestinales [10]. Entre las tecnologías de imágenes disponibles, la microscopía láser confocal genera una imagen 2D nítida en el plano de enfoque y gracias al barrido del láser en el eje z, se obtendrá una serie de secciones ópticas 2D a diferentes profundidades en la muestra, lo que permite la construcción final de una imagen 3D de elevada resolución [11].

Desde hace años, nuestro grupo, viene estudiando, desarrollando, implementando y utilizando la microscopia de desconvolución digital, al estudio de especímenes biológicos de gran espesor [9, 12-15], con el objetivo de obtener imágenes tridimensionales y cuantitativas de gran resolución.

En el presente trabajo se aplicó una metodología que combina: extracción de la mucosa completa, visualización por microscopia láser confocal (MLC) y cuantificación volumétrica de variables morfológicas y moleculares, que posibilite resolución celular y subcelular. La metodología se analizó siguiendo el desarrollo del cáncer de colorrectal (CCR) murino, por inducción química con azoximetano y el agente proinflamatorio sulfato de dextrano sódico. Este sistema experimental presenta características similares a las desarrolladas en el ser humano, es razonablemente reproducible y permite reconocer el estadio de desarrollo del cáncer, así como cambios morfológicos tempranos característicos, como son los pólipos y los focos de criptas aberrantes [5, 16].

El trabajo desarrollado aporta a mejorar los procedimientos para la detección de neoplasias en estadios más tempranos. Una mejor comprensión de las propiedades tisulares tanto en estado fisiológico como patológico, podría contribuir, en un futuro, a la introducción de modificaciones en los diseños de sistemas basados en diagnóstico óptico.

METODOLOGÍA

Desarrollo del modelo murino de CCR

Se emplearon ratones machos adultos de la cepa BALB/cCmedc, con un peso promedio de 25 g. Los ratones fueron provistos por el Centro de Medicina Comparada (UNL – CONICET – ICIVET LITORAL) y mantenidos durante los tratamientos, en condiciones óptimas en el bioterio de la FI-UNER, el cual fue acondicionado para tal fin. La temperatura ambiente fue mantenida a 25 °C y los ciclos de luz/oscuridad fueron de 12:12 h (Figura 1).



Figura 1. Ratones de la cepa BALB/cCmedc utilizados en el proyecto.

Los ratones fueron alimentados ad-libitum con extrusado de ratón y el agua de beber fue esterilizada por autoclavado y acidificada. Las jaulas y bebederos fueron higienizados y desinfectados dos veces por semana.

En todos los casos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, e inmediatamente, los intestinos fueron removidos y procesados para su visualización. La totalidad de los experimentos fueron realizados siguiendo las pautas establecidas en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio [17] y en la ley N° 14346 sobre malos tratos y actos de crueldad a los animales.

El CCR fue inducido a través de la aplicación intraperitoneal de Azoximetano (AOM), un derivado de la 1,2-dimetilhidrazina, seguido de la administración por vía oral de sulfato de sodio dextrano (SSD). Se aplicó el protocolo [16, 18, 19] con leves modificaciones. Los ratones fueron inyectados al día 0 del experimento con una dosis intraperitoneal de 10 mg/kg de AOM (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA). La solución madre de AOM fue preparada a una concentración de 50 mg/ml en solución fisiológica. Ésta fue fraccionada en tubos Eppendorf que fueron almacenados a -20 °C hasta su empleo. La solución a inyectar fue preparada a una concentración final de 1,25 mg/ml, permitiendo administrar la dosis indicada, en volúmenes relativamente pequeños (en ningún caso se emplearon volúmenes superiores a 250 µl).

Una semana después de la inyección con AOM, los animales fueron tratados vía oral durante 7 días con DSS (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) diluido al 2% (P/V) y colocado en el agua de beber (Figura 2). A partir del día de la inyección, los animales fueron sacrificados a las 2, 4 y 8 semanas y el colon distal diseccionado. Los segmentos intestinales obtenidos de los animales tratados con AOM/DSS fueron sometidos a los mismos procedimientos y estudios que los tejidos obtenidos de animales normales. En algunas experiencias, también se tomaron muestras a las semanas 16 y 20. Los animales control fueron inyectados con solución fisiológica.

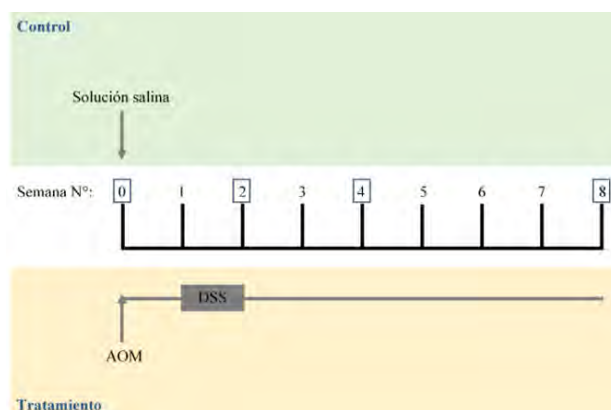


Figura 2. Protocolo de inducción de carcinogénesis colorrectal mediante AOM/DSS.

Tal como lo indican los recuadros azules de la Figura 2, los sacrificios por dislocación cervical fueron llevados a cabo durante el día 1 (tiempo 0) para los animales control, y en la segunda (2da), cuarta (4ta) y octava (8va) semana para los tratados. En cada caso, se expuso el lado ventral del animal hacia arriba, fijando las extremidades y cortando el pelaje para que no interfiriera con la posterior disección. Realizando una incisión abdominal e identificado el ciego, se extrajo el intestino grueso y se disecó el colon distal (Figura 3). Éste se colocó en una placa de Petri con solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X), se le retiró la materia fecal y se lo abrió en sentido longitudinal.

Todo el procedimiento se realizó sobre una cama de hielo para bajar la temperatura.
El procedimiento completo se realizó por duplicado.



Figura 3. Procedimiento de disección y análisis macroscópico del colon distal. Imágenes ilustrativas de un animal y de 4 colon distal para cada instante de tiempo.

Microscopia laser confocal y cuantificación tridimensional de la mucosa murina

La mucosa fresca del colon fue visualizada utilizando el microscopio laser confocal LSM 880 de la empresa Carls Zeiss (figura 4). Se obtuvo un volumen de 80 secciones ópticas cada una de ellas separadas en 1 μm (figura 5); utilizando la lente objetiva de 20X y AN 0,75 y el láser argón de 514 nm.



Figura 4: Microscopio laser confocal LSM880 (Carls Zeiss) ubicado en el Laboratorio de Microscopía Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LMAE)

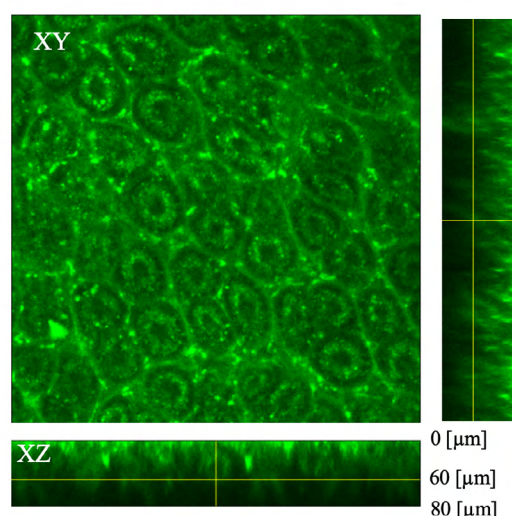


Figura 5: Imagen 3D (512 x 512 x 80 μm) de la mucosa fresca del colon murino normal. Visión ortogonal de 80 secciones ópticas separadas 1 μm entre sí. De las vistas XZ y YZ se puede observar que la señal de autofluorescencia disminuye considerablemente por debajo de las 60 μm de profundidad.

Como se puede ver en la imagen, se obtuvo una visualización clara de los orificios de las criptas y una profundidad de penetración de 80 μm . Si bien con el microscopio laser confocal se logró penetrar más (80 μm) que con el microscopio de fluorescencia convencional (50 μm), no obstante se observa de los cortes ortogonales que no se obtiene buena señal en las últimas secciones del volumen. Comparando entonces, podemos concluir que el microscopio laser confocal permite obtener imágenes con señal/contraste más definido (permitiendo definir claramente las luces de las criptas de la mucosa) y se logra una definición en profundidad similar (aproximadamente entre 50 μm a 60 μm).

Definido los parámetros de adquisición, se obtuvieron los volúmenes para los distintos puntos de muestreo día 1 (tiempo 0), segunda (2da), cuarta (4ta) y octava (8va) semana. Sobre cada uno de estos volúmenes se definió un protocolo de segmentación y cuantificación 2D y 3D. Los mismos se pueden aplicar tanto para los volúmenes del microscopio convencional como para los obtenidos con el microscopio laser confocal.

Segmentación

Se desarrolló un método de segmentación específico para los conjuntos de imágenes de ambos estudios experimentales con el objetivo de obtener el mayor número de fosas del conjunto de datos completo. Aun así, en el método propuesto se introdujeron algunos pasos alternativos basados en una característica visualmente notable del tejido epitelial de la cripta: imágenes en las cuales las fosas se encuentran delimitadas claramente por la emisión de autofluorescencia circundante y aquellas cuyas fosas no poseen la misma característica. El establecimiento de estas variaciones definió al método de segmentación con dos vías alternativas, que fueron seleccionadas y aplicadas a cada imagen 3D después de una evaluación visual de la misma a juzgar por la representación de las fosas observadas en ella.

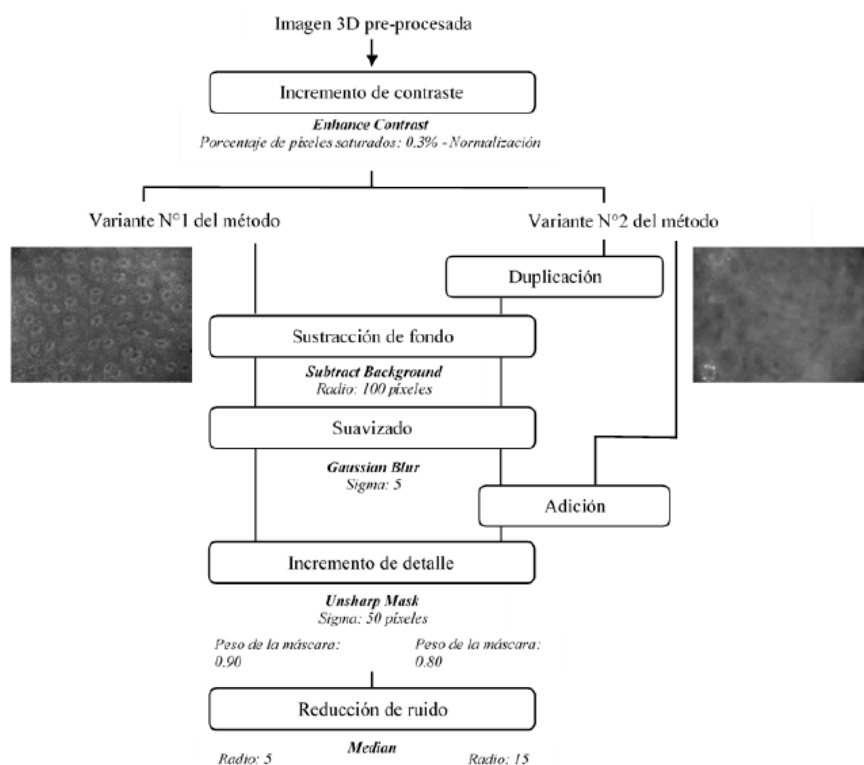
Para simplificar las siguientes referencias, serán denominadas Variante N°1 y Variante N°2. El flujo de trabajo de la Figura 6 describe el algoritmo, especificando paso a paso cada etapa, los plugins utilizados, la configuración de parámetros e imágenes ejemplo para cada una de las dos opciones mencionadas.

Una vez definida la estrategia de segmentación la misma fue implementada en una macro (una por cada propuesta). Las bases de esta metodología de segmentación fueron sentadas a partir de un método 2D diseñado para el análisis de muestras de tejido epitelial intestinal extraídas del conjunto de datos de experiencias previas [15].

Cuantificación

Las imágenes procesadas según lo especificado en la sección anterior fueron utilizadas en la etapa de cuantificación morfológica en la cual se obtuvieron medidas geométricas y de forma de las fosas de las criptas presentes en el volumen tratado. Dichos parámetros fueron seleccionados examinando las características que usualmente tienen en cuenta los patólogos que estudian la histopatología del tejido colorrectal en busca de signos de displasia, como criptas alargadas o ramificadas, grupos de criptas o criptas de tamaño anormal, contornos irregulares, entre otras.

Se desarrollaron las macros necesarias para la implementación de las metodologías propuestas tanto para cuantificaciones 2D como 3D, cuyas etapas de procesamiento se encuentran esquematizadas en la Figura 8.



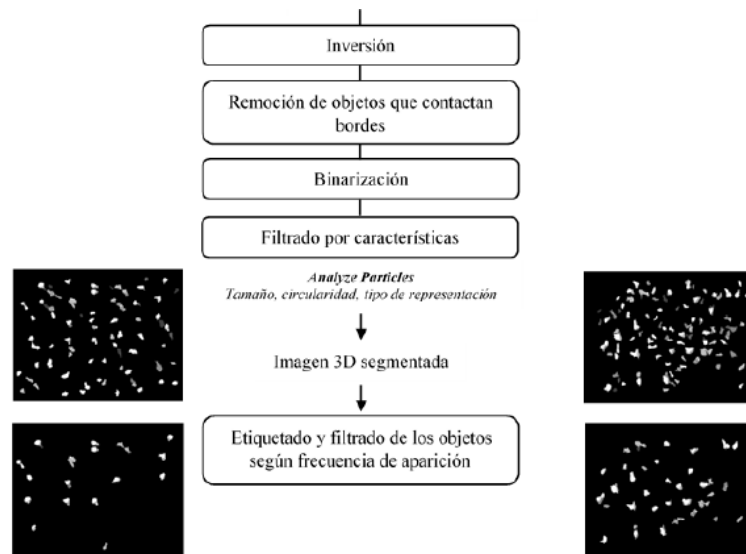
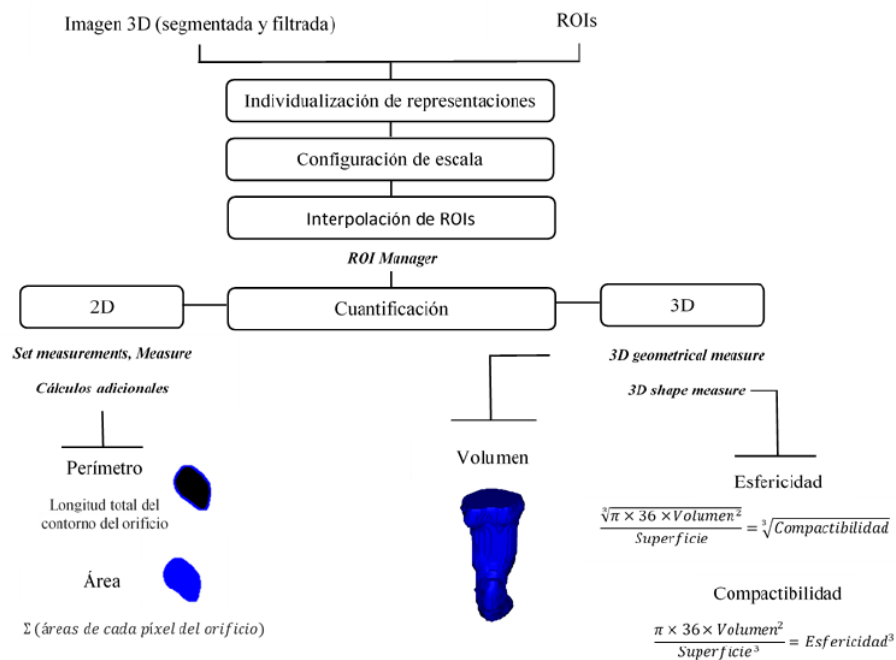


Figura 7: Metodología de segmentación



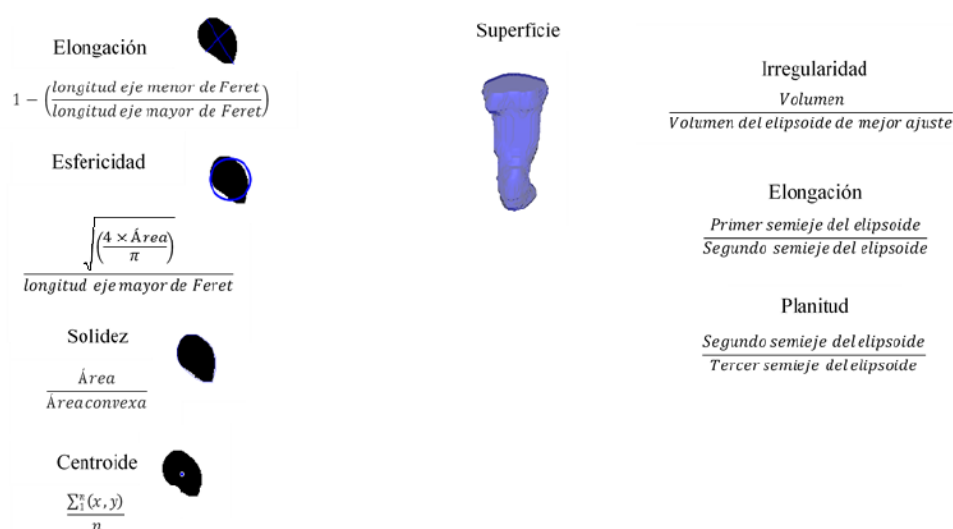


Figura 8: Metodología de cuantificación morfológica

Microscopia del tiempo de vida de la fluorescencia y cuantificación metabólica

Utilizando el mismo microscopio confocal se realizó la técnica de imágenes del tiempo de vida de la fluorescencia. Para ello, de los sistemas láseres que posee el equipo, dos de ellos se pueden configurar como pulsados. Para este estudio se trabajó con el láser de 405 nm.

El tiempo de vida de la fluorescencia es una propiedad de la fluorescencia que describe el tiempo en que un fluoróforo en estado excitado vuelve a su estado fundamental, y la microscopía de tiempo de vida de la fluorescencia (FLIM) es una técnica que utiliza su tiempo de vida para generar imágenes resueltas en el espacio, proveyendo otra dimensión de información para visualizar fluoróforos y otra fuente de contraste para generar imágenes [20].

La técnica de FLIM puede utilizarse, entre otras cosas, para caracterizar tejidos mediante autofluorescencia. La autofluorescencia es característica de los tejidos por lo que puede utilizarse para detectar anomalías en ellos, por ejemplo, en el caso de un tumor. Este último caso se basa en variaciones de metabolismo en las células neoplásicas, los cuales pueden detectarse a partir de las coenzimas NAD(P)H y FAD [21].

El NAD(P)H y FAD son fluoróforos de especial interés para el presente trabajo debido a que son coenzimas que participan en el metabolismo celular, por lo que pueden ser utilizados como sensores de estado metabólico [22]. Estas coenzimas se encuentran en el citoplasma celular, pero con la particularidad de que pueden estar libres o ligadas a proteínas, lo cual afecta al tiempo de vida de la fluorescencia. El NAD(P)H ligado a proteínas, tiene un tiempo de vida mayor que el NAD(P)H libre, mientras que el FAD ligado a proteínas, tiene un tiempo de vida menor al FAD libre [22]. La proporción entre NAD(P)H libre y ligado, y entre FAD libre y ligado varía según el metabolismo. En

las células normales predomina la fosforilación oxidativa, mientras que en las células neoplásicas predomina la glicólisis reductiva, por lo cual la proporción entre estas variantes es una potencial magnitud para diferenciar entre estos tipos celulares [22].

La cantidad de moléculas fluorescentes tiene un comportamiento exponencial según:

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau}$$

Sin embargo, esa expresión es válida para cada tipo de fluoróforo por separado. Para el caso del NAD(P)H y FAD que se encuentran tanto libre como ligados, hay que tener en cuenta los dos componentes por separado, es decir, un modelo bi-exponencial:

$$N(t) = a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2}$$

En la cual a_1 y τ_1 corresponden a la componente rápida (menor tiempo de vida), mientras que a_2 y τ_2 corresponden a la componente lenta. Para el caso de NAD(P)H la componente rápida es el libre, mientras que la componente lenta es el ligado. Para el caso del FAD es lo opuesto, la componente rápida es el ligado, mientras que la componente lenta es el libre.

En la figura 9 se observa las componentes de las aproximaciones bi-exponenciales

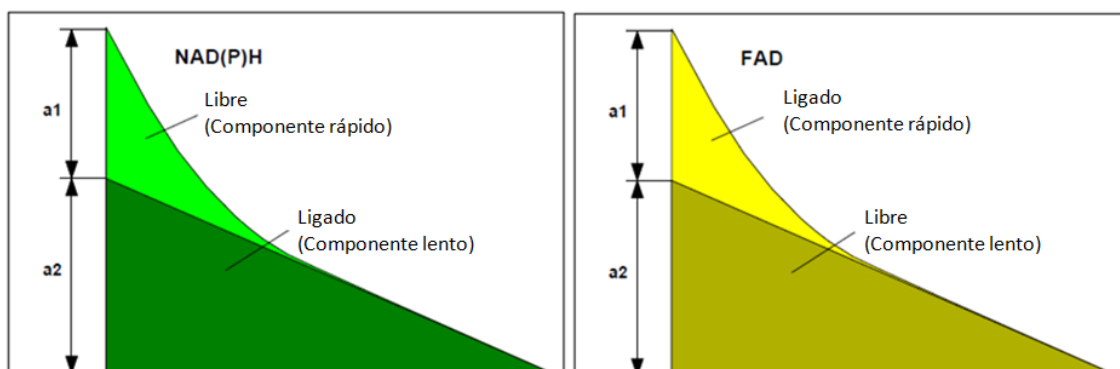


Figura 9: Componentes de la aproximación bi-exponencial para el NAD(P)H y FAD

A partir del modelo bi-exponencial, además de los parámetros explícitos, surgen diferentes parámetros potenciales para discriminar entre células normales y patológicas. Entre ellos se destaca:

- Relación de amplitudes : este parámetro representa la relación entre las dos componentes ligadas y libres.
- Tiempo de vida medio : este parámetro es un promedio ponderado entre la dos componentes y se define como:
- Relación Redox basado en el tiempo de vida de la fluorescencia: este parámetro se define a partir de las relaciones de amplitudes de las componentes ligadas y libres del NAD(P)H y FAD. Se define como:

El equipo cuenta con un módulo de FLIM, cuyos detectores y esquema puede verse en la figura 10. En (a) marcados en rojo están los detectores de FLIM Zeiss Big 2. Se trata de dos detectores ultra rápidos, que permite la visualización de dos canales simultáneos. En (b) se observa el recorrido de la luz láser en azul, que pasa por el cabezal confocal, llega a la muestra, se produce la fluorescencia, retorna al cabezal confocal y es dirigida al módulo de FLIM. En blanco, presenta un cubo de filtros, que, a través de un espejo dicróico, transmite ciertas longitudes de onda, para que lleguen a uno de los detectores, y refleja otras longitudes de onda, para que lleguen al otro detector, y así tener información diferente en cada canal. Las configuraciones de filtros son:

Cubo 1: Canal 1: 380 [nm]-430[nm], canal 2: 465[nm] – 515[nm].

Cubo 2: Canal 1: 420[nm] – 480[nm], canal 2: 500[nm] – 550[nm].

Este sistema de FLIM se basa en la modalidad de conteo de fotones únicos correlacionados en el tiempo (TCSCP), controlado por el Módulo 152N de Becker & Hicks [23].

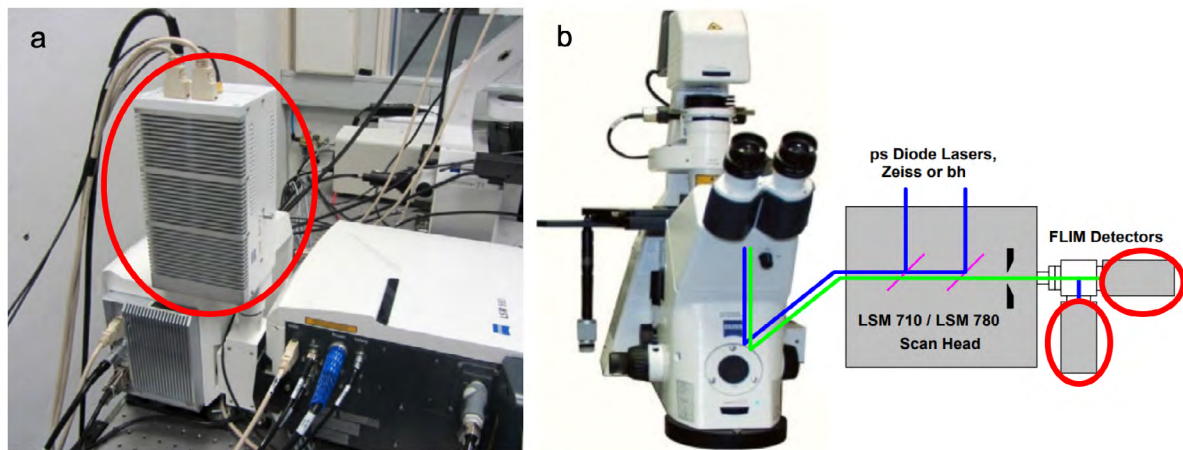


Figura 10. En (a) se observa marcado en rojo los detectores de FLIM Zeiss Big 2. En (b) en azul se muestra el recorrido de la luz láser, que surge de los láseres diodo, de tipo pulsado, que ingresa al cabezal confocal, llega a la muestra, y de allí surge la señal fluorescente graficada en verde, que retorna al cabezal confocal y se dirige a los dos detectores de FLIM marcados en rojo.

Adquisición y procesamiento de las imágenes de la mucosa murina por FLIM

Para los experimentos de este trabajo, se realizaron dos tipos de adquisiciones. Por un lado, se tiene la adquisición de imágenes de FLIM, y adquisiciones de imágenes confocales, que sirven principalmente como referencias para observar la morfología de las criptas colónicas. Previo al inicio de los experimentos, se realizó una serie de pruebas para seleccionar los parámetros y configuración óptima para la adquisición de las imágenes. Los principales son la selección de la lente y el láser.

Con respecto a la lente, tanto para FLIM como para las imágenes confocales, se optó por la lente Zeiss EC Plan-Neofluar (20x/0.80) en aire, ya que el aumento de 20X permite tener el campo suficiente para ver una gran cantidad de criptas, y el aumento adecuado para observar de manera correcta su morfología y entorno celular. Con respecto a los láseres, para el caso de FLIM, si bien el equipamiento permite realizarlo con el láser de 405 [nm] y el de 440[nm] se optó solo por utilizar el de láser de 405[nm].

Por cada muestra montada en el microscopio (se tomó una muestra por ratón), se realizaron tres adquisiciones distintas, todas siguiendo el siguiente protocolo. El primer paso una vez montada la muestra en el microscopio, fue realizar escaneos rápidos a través de microscopía confocal, con el objetivo de encontrar un campo que permitan visualizar de manera adecuada una gran cantidad de criptas colónicas. Para ello, se configura el láser de 405[nm] de manera continua, y se inicia el escaneo, a través de la herramienta “Live” del software del microscopio (Zen), que permite la máxima velocidad de escaneo a baja resolución.

Una vez encontrado el campo óptimo, el siguiente paso es realizar la adquisición de FLIM. Para ello, se configuró el láser de 405[nm] de manera pulsada, con una frecuencia de repetición de pulsos de 50 [MHz]. Se selecciona el cubo de filtros 2, donde en el canal 1 se recolecta información del NAD(P)H + FAD (principalmente NAD(P)H) mientras que en el canal 2 se recolecta información solo del FAD. Para iniciar la adquisición de FLIM, se utiliza la herramienta “continuous” del software del microscopio, y se adquiere durante un tiempo de 3 minutos, gestionado por el software de FLIM (SPC), el cual permitía recolectar una gran cantidad de fotones por píxel, mejorando la fiabilidad de los resultados, sin extender demasiado el tiempo de adquisición. El tamaño de la imagen de FLIM resultante es de 512x512 píxeles, adquirida con una resolución temporal de 20 [ps], debido a los 1024 canales temporales que provee el hardware del equipo.

Cuantificación de los tiempos de vida de la fluorescencia

Cada una de las imágenes FLIM adquiridas de 512x512 píxeles, se dividió en cuatro imágenes de 256x256 píxeles y a través del software SPCImage se generó una máscara o ROI (región de interés) que encierra cada una de las criptas, dejando afuera la lámina propia, en la cual no hay presencia de NAD(P)H y FAD. Tanto la división de las imágenes como las máscaras pueden observarse en la figura 11. El software SPCImage se configura para que calcule los parámetros de FLIM con una aproximación bi-exponencial (debido a que tanto NAD(P)H y FAD pueden estar libres o ligados). Una vez calculado, se obtienen los parámetros de interés t_1 , t_2 , t_m , A_1 , A_2 de ambos canales, donde el canal 1 tiene información del NAD(P)H y el canal 2 tiene información del FAD. El software calcula estos parámetros para cada uno de los píxeles de la imagen, sin importar la división en cuadrantes previa, ni los ROI generados, por lo que se exportan como varias matrices (una matriz por cada parámetro) de 512x512.

Para solucionar este problema, como la información relevante es la que se encuentra dentro del ROI, a través de un script realizado con Python 3 se toma cada una de las matrices de parámetros, se las divide en los 4 cuadrantes, generando 4 matrices de 256x256 por imagen, y se calcula el valor promedio de los píxeles que se encuentran dentro de las máscaras. Por lo tanto, por cada imagen adquirida, se obtiene 4 valores por parámetro, que representa el promedio obtenido dentro de cada cuadrante. En promedio, cada uno de los cuadrantes tiene unos 20.000 píxeles que se encuentran dentro del ROI, por lo que, con la totalidad de las imágenes, se tienen más de 3.500.000 píxeles cuantificados.

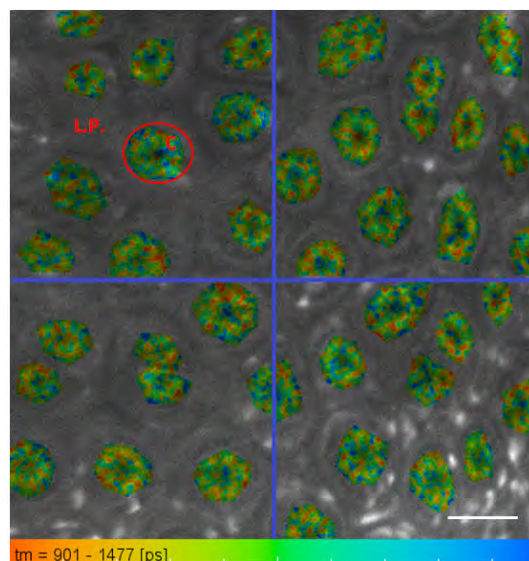


Figura 11: Imagen de ejemplo donde se observa la división en 4 campos de 256x256 y se visualizan las máscaras aplicadas. En colores se ven las criptas (una en (c)) y en gris y blanco la lámina propia (L.P.). Barra de escala = 50 [μm].

RESULTADOS

Cuantificación y caracterización morfológica 3D

El conjunto de datos arrojados por las cuantificaciones morfológicas 3D se resume en los cuadros 1 y 2, los cuales exponen los valores de mediana y rango intercuartil tanto para las medidas geométricas de volumen y superficie, como para las de forma como compactibilidad, esfericidad, elongación, planitud e irregularidad. Cada estudio experimental considera un total de 247 y 897 fosas 3D, contando con 22 y 191, 9 y 138, 105 y 469, 111 y 99 objetos de interés de tiempo cero y 2da, 4ta y 8va semanas de tratamiento con AOM/DSS.

Por otro lado, los gráficos de barras de las figuras 12 a 14 exponen la variación de cada parámetro, utilizando la media y desviación estándar. A su vez, se indican las diferencias estadísticamente significativas halladas entre diferentes puntos muestrales para una misma variable en análisis.

Los valores de mediana reportados para mediciones geométricas como volumen y superficie aparentan evolucionar de manera diferente en el inicio de cada estudio, entre tiempo cero y 2da semana de tratamiento. Sin embargo, en ambos casos la 4ta semana contiene las representaciones con mayor volumen y superficie, y en general, mayor variabilidad. Al igual que en el análisis 2D, las medianas de algunas mediciones de forma se incrementan o disminuyen comparando representaciones de fosas control frente a las tratadas con AOM/DSS, mientras que otras adquieren valores similares entre control y el inicio de la inducción del CCR en la 2da semana. En particular, la esfericidad y compactibilidad disminuyen con la progresión del tiempo desde el comienzo del tratamiento, generalmente acompañado de un incremento de variabilidad morfológica. La elongación y planitud, presentan medianas similares en tiempo cero y 2da semana, alterándose con posterioridad, disminuyendo e incrementándose, respectivamente. Por último, las medianas de la irregularidad son similares en las etapas analizadas en el primer estudio experimental, aunque no lo son en el segundo, en el cual disminuyen a medida que el tratamiento avanza.

Tiempo	Estudio (N°)	Fosas (N°)	Volumen (μm^3)	Superficie (μm^2)
0	1	22	11.255,05 (9.455,82-16.740,44)	5.438,36 (4.699,01-6.568,76)
	2	191	12.233,68 (10.237,11-14.363,02)	5.343,20 (4.803,96-6.137,87)
2	1	9	9.226,75 (8.102,69-10.971,57)	4.996,26 (4.592,99-6.726,93)
	2	138	13.254,61 (10.973,07-15.652,45)	5.673,55 (4.947,30-6.378,66)
4	1	105	23.544,90 (13.851,84-31.860,57)	9.336,77 (5.980,84-13.878,99)
	2	469	14.481,90 (12.126,00-18.056,45)	6.298,06 (5.455,14-7.364,20)
8	1	111	17.755,51 (13.094,04-25.910,38)	8.384,34 (6.422,00-11.580,27)
	2	99	11.539,11 (9.514,45-14.748,97)	5.434,72 (4.493,01-6.716,42)

Cuadro 1: cuantificación 3D: Descriptores geométricos

Tiempo	Estudio (N°)	Fosas (N°)	Esfericidad	Compactibilidad	Irregularidad	Elongación	Planitud
0	1	22	0,45 (0,43-0,47)	0,09 (0,08-0,11)	0,70 (0,64-0,78)	2,58 (2,02-3,07)	1,37 (1,23-1,80)
	2	191	0,49 (0,44-0,52)	0,12 (0,09-0,14)	0,80 (0,74-0,85)	2,55 (2,27-2,87)	1,36 (1,23-1,54)
2	1	9	0,43 (0,41-0,43)	0,08 (0,07-0,08)	0,69 (0,64-0,72)	2,61 (2,29-2,64)	1,43 (1,36-1,61)
	2	138	0,48 (0,45-0,51)	0,11 (0,09-0,13)	0,85 (0,80-0,88)	2,56 (2,20-2,81)	1,32 (1,17-1,50)
4	1	105	0,41 (0,35-0,46)	0,07 (0,04-0,10)	0,71 (0,60-0,79)	1,82 (1,41-2,46)	1,86 (1,45-2,77)
	2	469	0,46 (0,44-0,49)	0,10 (0,08-0,12)	0,76 (0,70-0,82)	2,15 (1,82-2,51)	1,51 (1,28-1,83)
8	1	111	0,39 (0,36-0,43)	0,06 (0,05-0,08)	0,67 (0,60-0,74)	1,72 (1,50-2,09)	1,64 (1,38-2,08)
	2	99	0,46 (0,42-0,48)	0,10 (0,08-0,11)	0,75 (0,66-0,80)	2,33 (1,88-2,72)	1,53 (1,32-1,85)

Cuadro 2: cuantificación 3D: Descriptores de forma

El cotejo de análisis estadísticos de la media de cada parámetro, considerando a ambos estudios experimentales, halló diferencias significativas en volumen e irregularidad entre las representaciones de control y todos los puntos muestrales de tratamiento. Las medidas restantes hallaron las mismas diferencias estadísticamente significativas exceptuando a tiempo cero y 2da semana. Por otro lado, todos los parámetros presentaron diferencias significativas entre todos los puntos de tiempo referentes a tratamiento, pero no fue detectable para la 4ta y 8va semanas en esfericidad y compactibilidad.

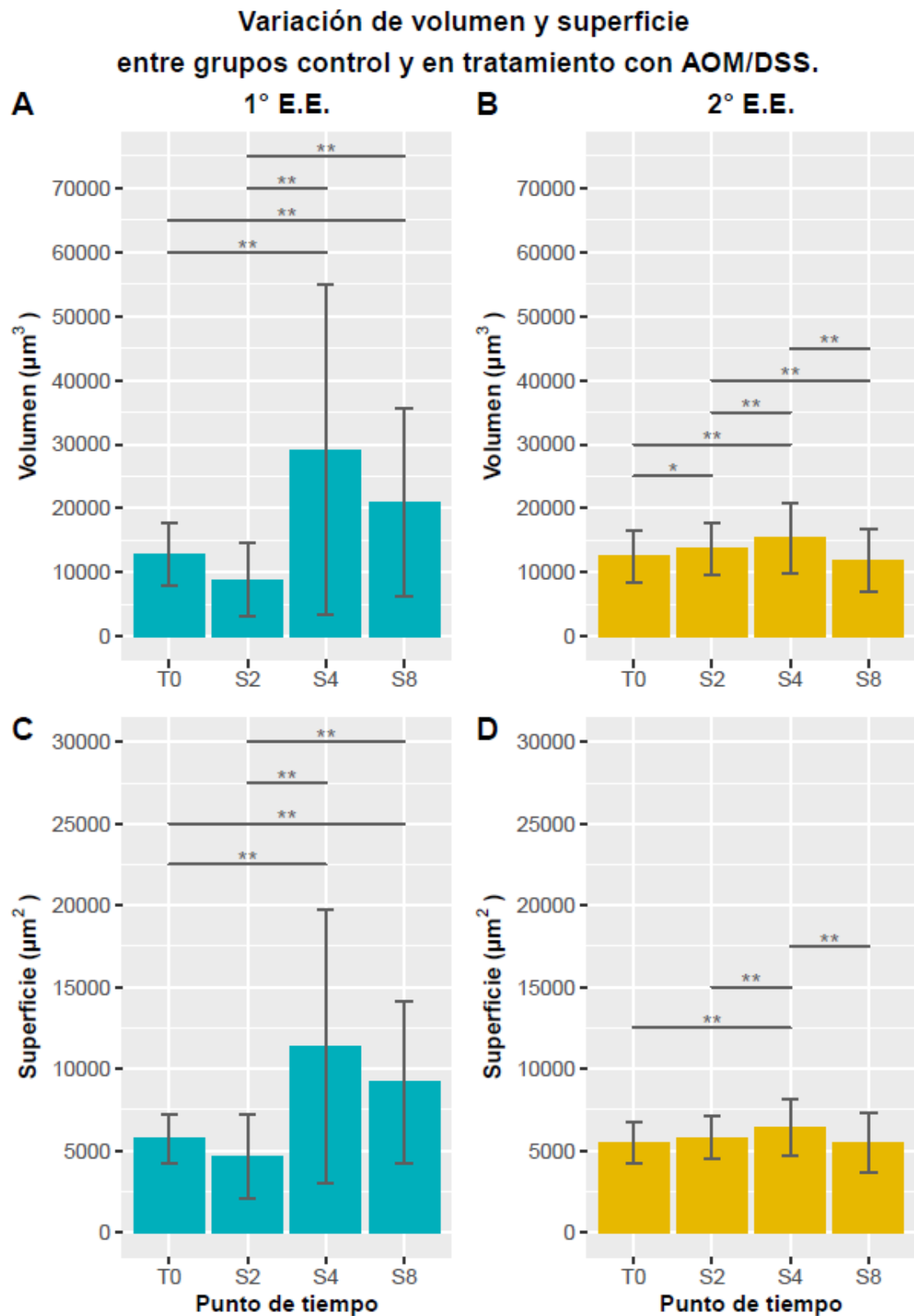


Figura 12: Representación de la media y desviación estándar del volumen (A, B) y superficie (C, D) para cada punto de tiempo. (*) y (**) indican valores $p < a$ niveles de significancia de 0,05 y 0,01, respectivamente

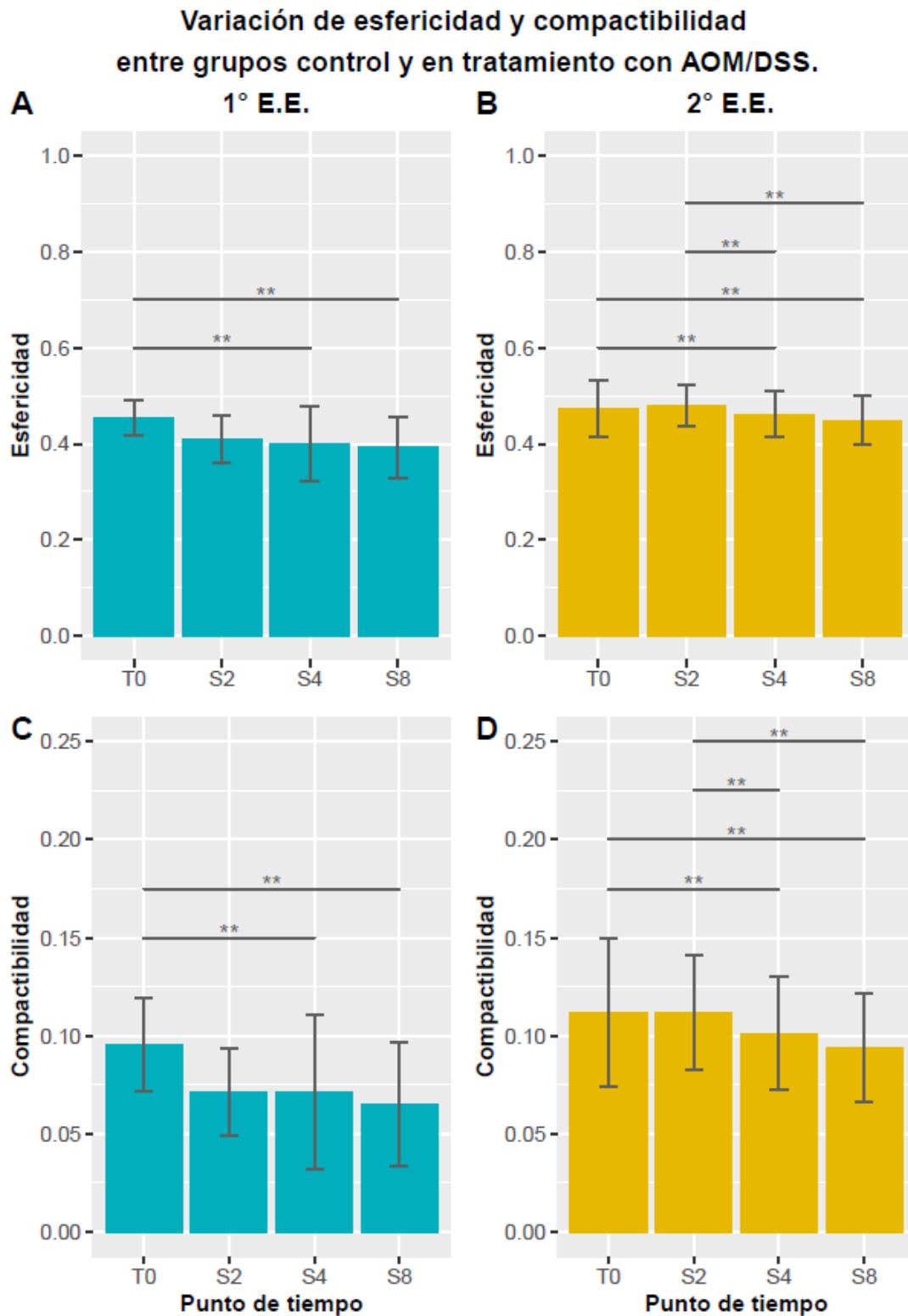


Figura 13: Representación de la media y desviación estándar de esfericidad (A, B) y compactibilidad (C, D) para cada punto de tiempo. (*) y (**) indican valores $p < a$ a niveles de significancia de 0,05 y 0,01, respectivamente

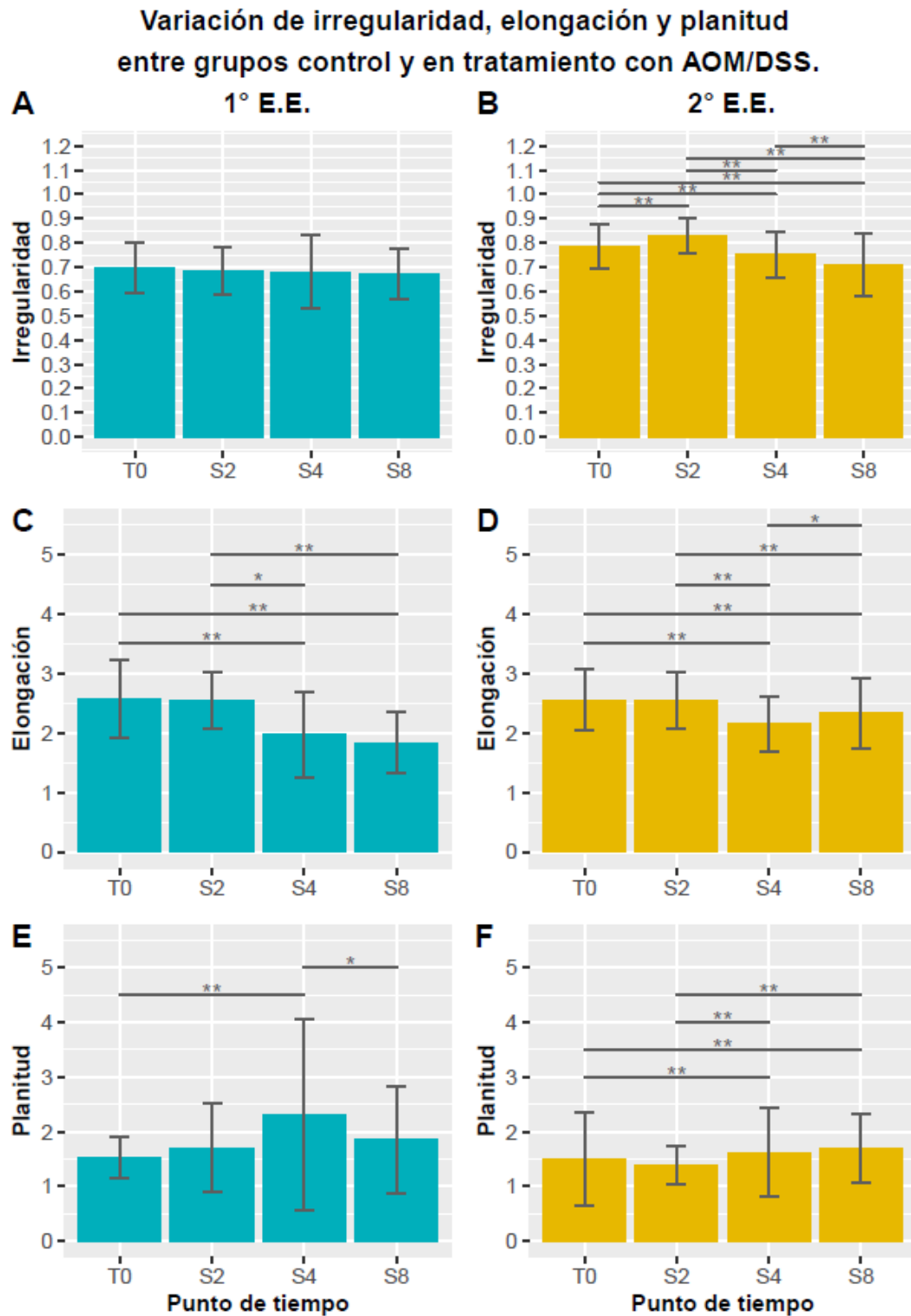


Figura 14: Representación de la media y desviación estándar de irregularidad (A, B), elongación (C, D) y planitud (E, F) para cada punto de tiempo. (*) y (**) indican valores $p < \alpha$ a niveles de significancia de 0,05 y 0,01, respectivamente

Las figuras 15 a 18 exhiben resultados de las etapas de segmentación, identificando a las representaciones caracterizadas, para un volumen de cada punto muestral. En cada caso, A y B presentan vistas superior e inferior de la imagen 3D, señalando en rojo a las fosas segmentadas y cuantificadas, mientras que C las extrae, añadiendo en celeste información sobre centroides. D determina en azul cuáles son las fosas incluidas en la caracterización, y E enseña seis de ellas acompañadas de sus respectivos datos cuantitativos.

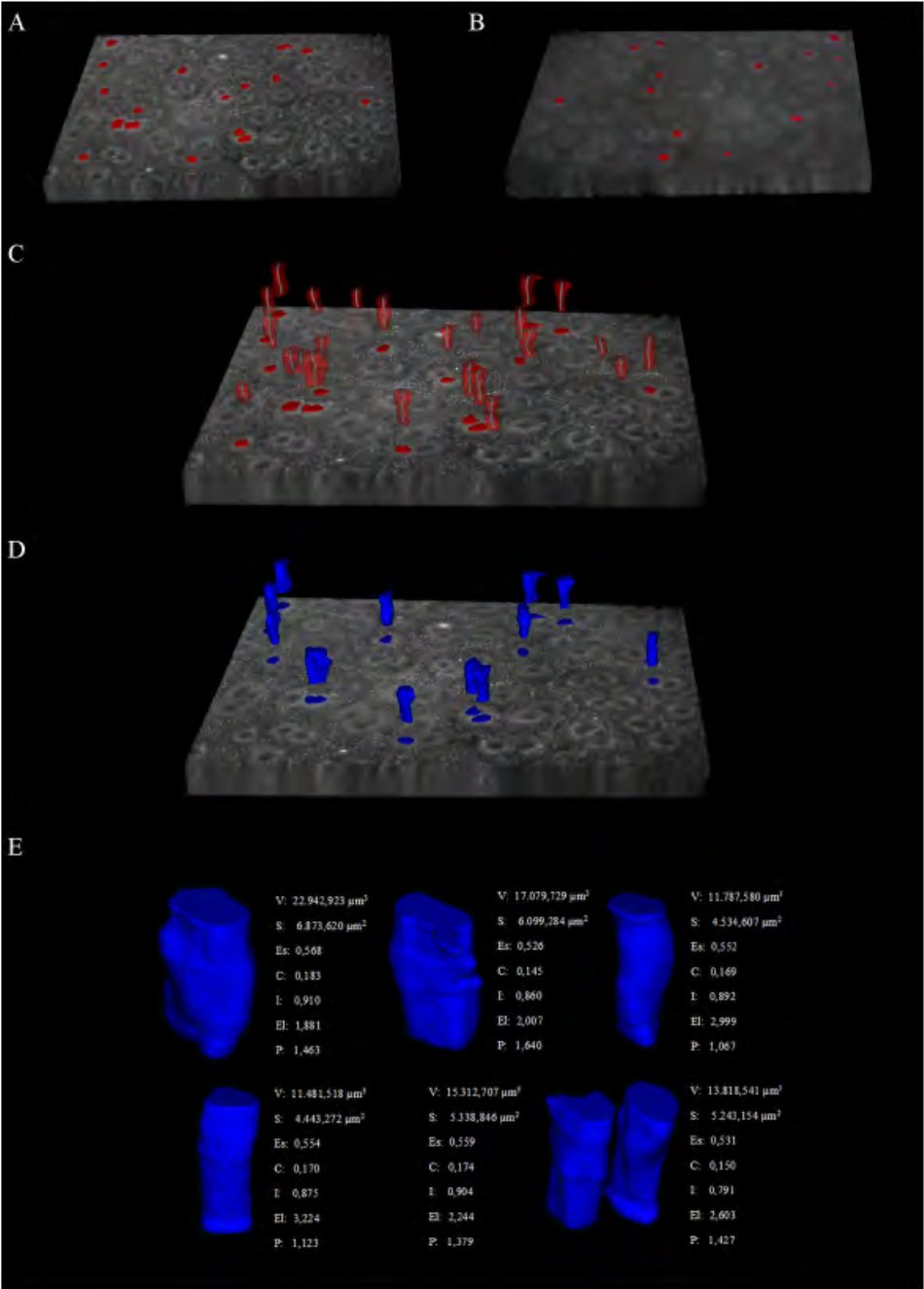


Figura 15: Volumen de tiempo cero con representaciones de segmentación (A-B: vistas superior e inferior, C: fosas segmentadas y centroides), identificación de fosas incluidas en la caracterización (D) y ejemplificaciones (E, donde V: volumen, S: superficie. Es: esfericidad, C: compactibilidad, I: irregularidad, El: elongación, P: planitud).

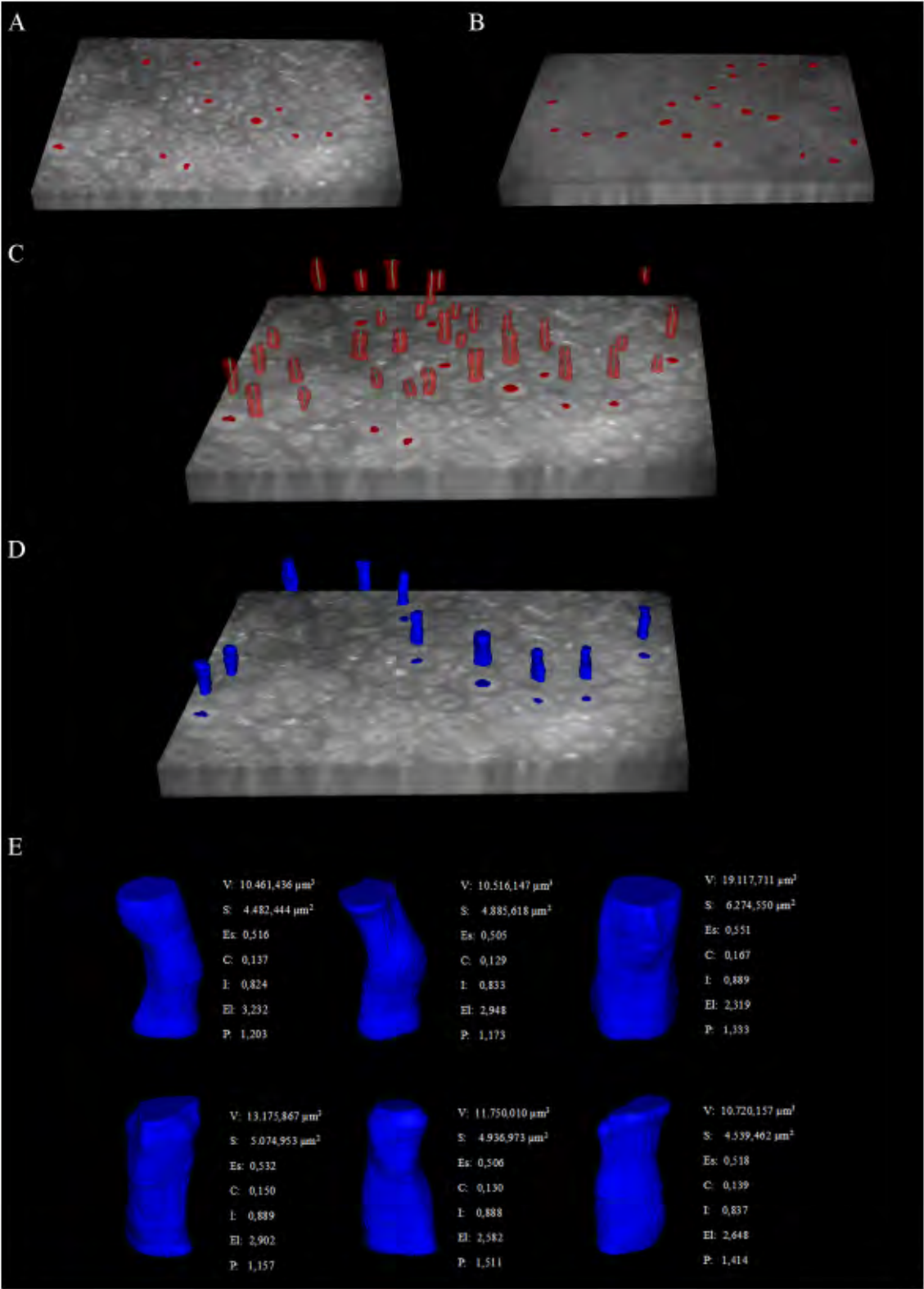


Figura 16: Volumen de 2da semana con representaciones de segmentación (A-B: vistas superior e inferior, C: fosas segmentadas y centroides), identificación de fosas incluidas en la caracterización (D) y ejemplificaciones (E, donde V: volumen, S: superficie, Es: esfericidad, C: compactibilidad, I: irregularidad, El: elongación, P: planitud).

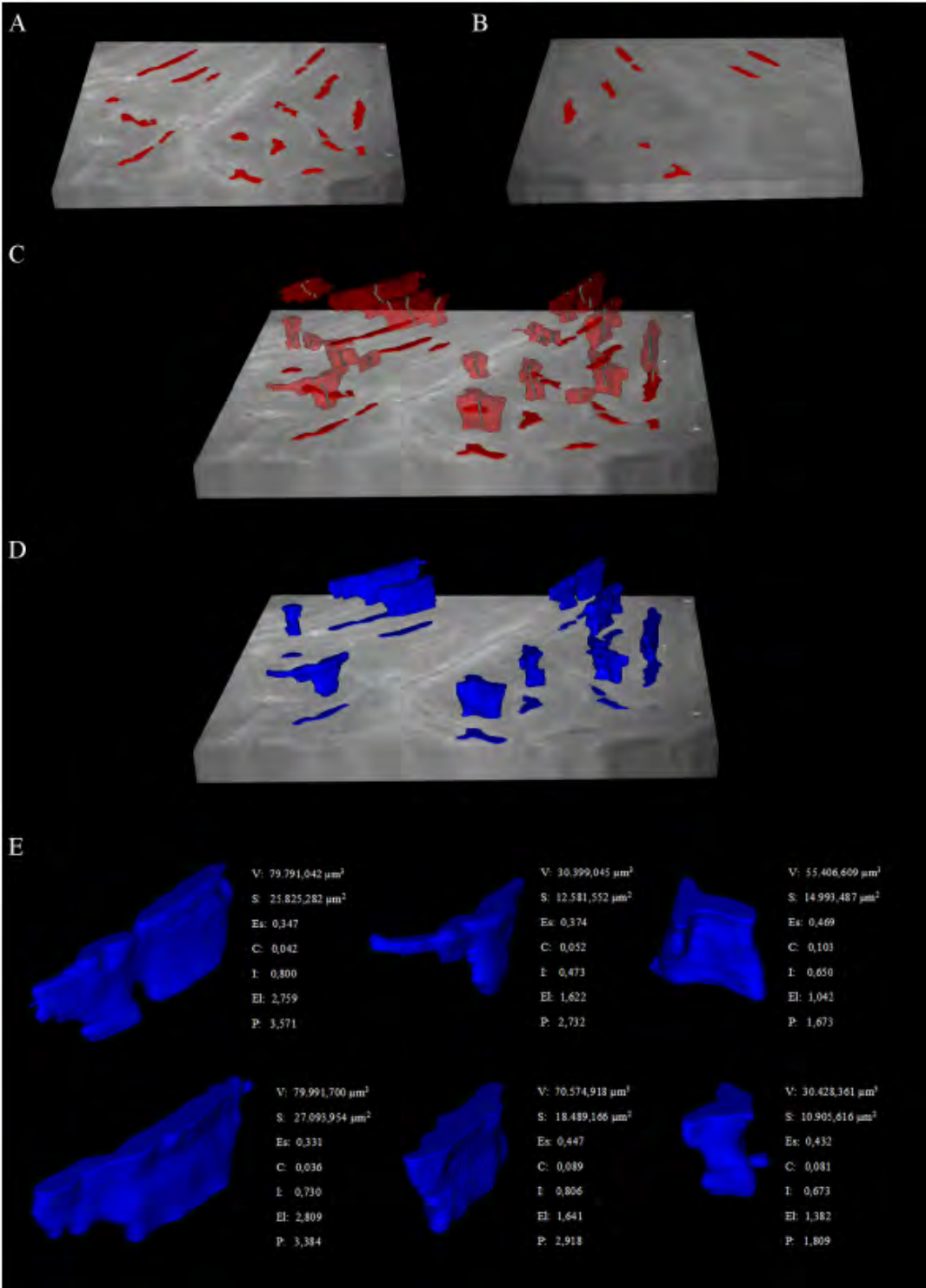


Figura 17: Volumen de 4ta semana con representaciones de segmentación (A-B: vistas superior e inferior, C: fosas segmentadas y centroides), identificación de fosas incluidas en la caracterización (D) y ejemplificaciones (E, donde V: volumen, S: superficie. Es: esfericidad, C: compactibilidad, I: irregularidad, El: elongación, P: planitud).

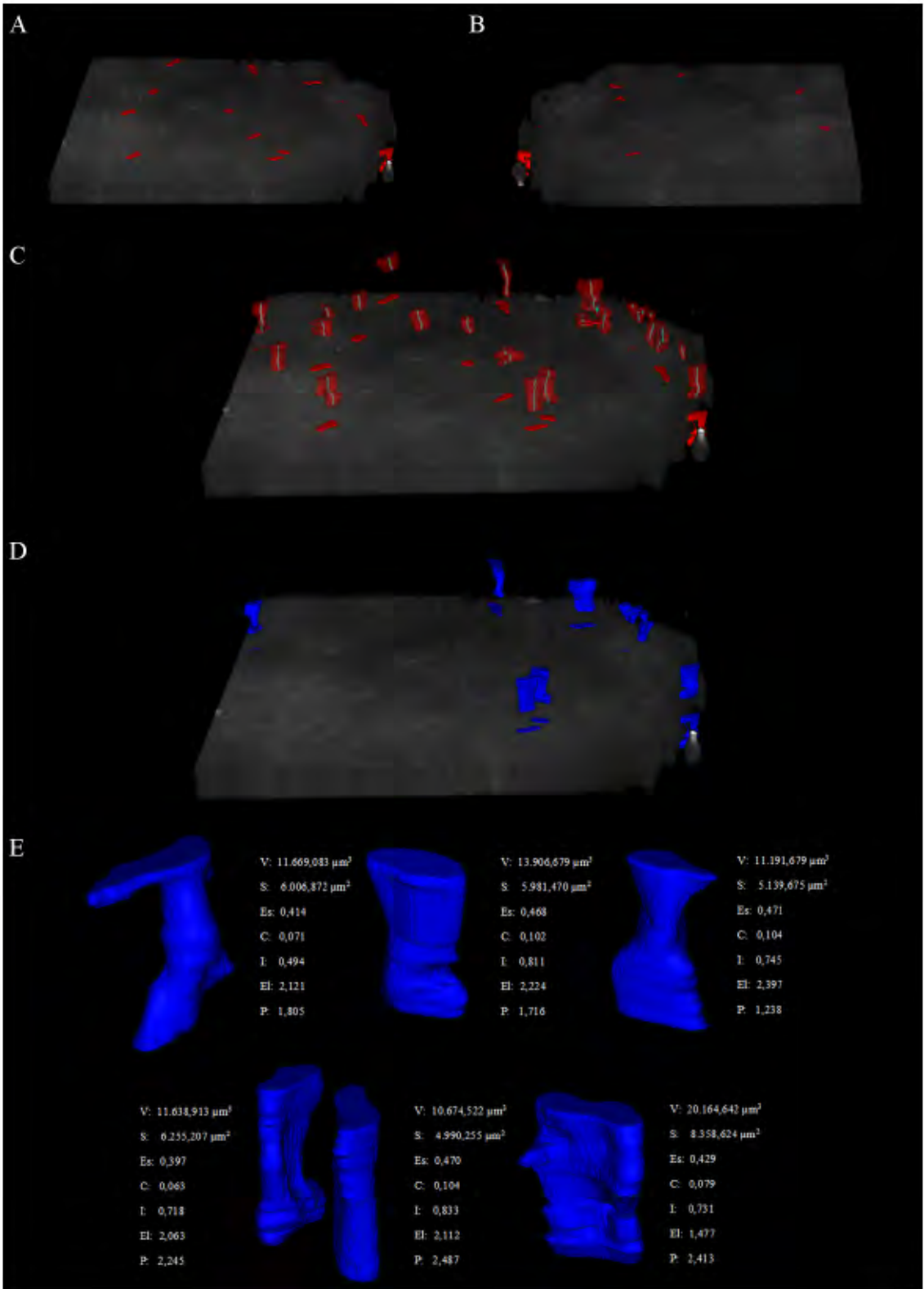


Figura 18: Volumen de 8ta semana con representaciones de segmentación (A-B: vistas superior e inferior, C: fosas segmentadas y centroides), identificación de fosas incluidas en la caracterización (D) y ejemplificaciones (E, donde V: volumen, S: superficie. Es: esfericidad, C: compactibilidad, I: irregularidad, El: elongación, P: planitud).

Por otro lado, la figura 19 expone cinco representaciones 3D para cada punto de tiempo en cada estudio experimental, que ejemplifican los cambios morfológicos observables. En complemento con la información cuantitativa obtenida y análisis realizados, se definieron las siguientes particularidades que caracterizarían a las fosas 3D:

- la forma es similar entre las no patológicas y las de 2da semana en tratamiento, aunque estas últimas presentarían mayor irregularidad en su superficie externa,
- reducen su volumen en la etapa inicial del tratamiento (2da semana), incrementando su valor medio y variabilidad en la 4ta semana, punto de tiempo en el que incrementan también su superficie externa,
- durante y posteriormente a la 4ta semana, su configuración se altera significativamente, con posibilidad de incrementar su grosor y elongación en el plano XY. Su superficie externa se ve afectada, extendiéndose a causa del incremento de irregularidad o rugosidad externa, lo que también incide en la rectitud de la orientación de las fosas.

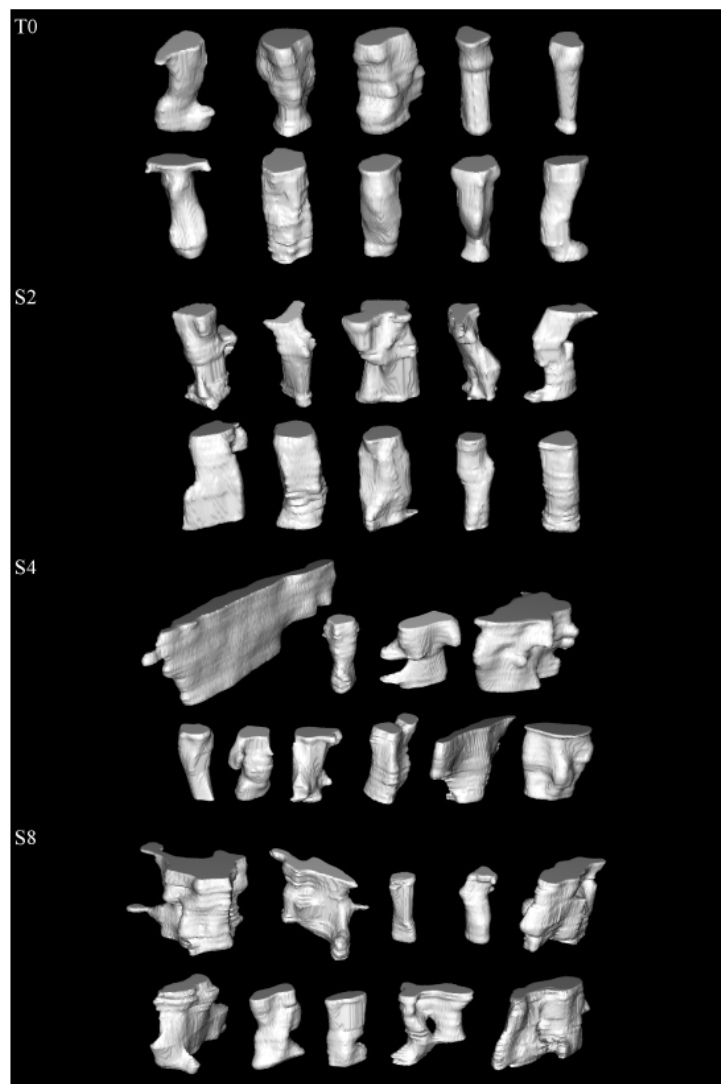


Figura 19: Representaciones 3D de fosas para cada punto de tiempo, seleccionadas a partir de imágenes 3D pertenecientes a seccionamientos ópticos y/o muestras diferentes.

Cuantificación metabólica

Uno de los datos más importantes a tener en cuenta es que, tanto las imágenes confocales como las de FLIM fueron obtenidas utilizando el mismo láser, el mismo sistema de escaneo, la misma lente, etc. Lo único que se cambió fueron los detectores, ya que para la técnica de FLIM se requieren detectores especiales, sin embargo, estos detectores son completamente compatibles con la microscopía confocal, por lo cual, con el mismo hardware, es posible obtener muchísima información de una sola adquisición. Incluso, puede verse que en todas las imágenes de FLIM, la morfología de las criptas y sus luces sigue siendo apreciable, aun cuando no fue el objetivo obtener imágenes de FLIM en las que se obtenga una buena información morfológica.

En la figura 20 se muestra las imágenes de FLIM obtenidas para el control, semana 2, semana 3 y semana 6 luego de la administración del AOM. Las criptas fueron seleccionadas con máscaras específicas y sobre ellas se cuantificaron los tiempos de vida en cada una de ellas.

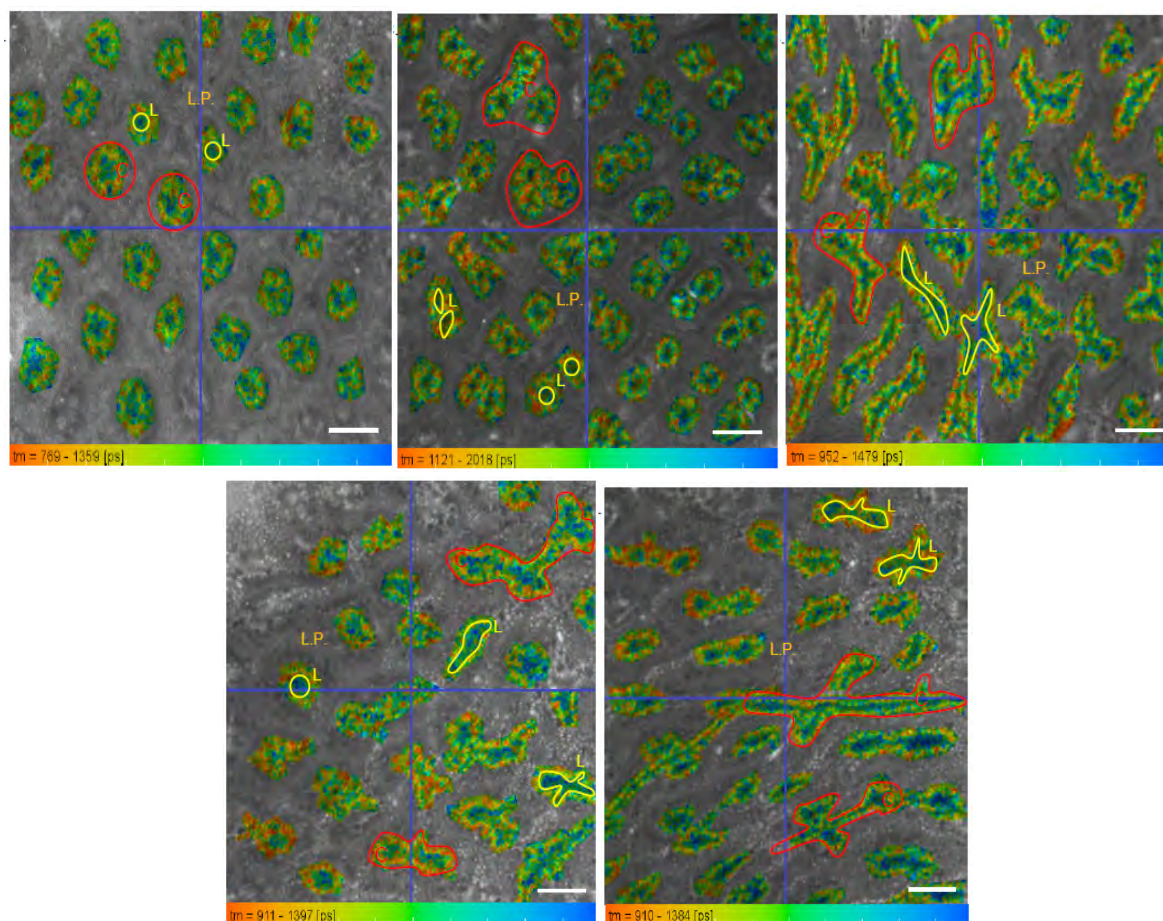


Figura 20: Imágenes representativas de FLIM en el modelo murino de CCR.

En la figura 21 se observa el diagrama de cajas para el parámetro FLIRR, el cual es máximo para las muestras de control y disminuye a medida que pasan las semanas y el tejido se vuelve más patológico.

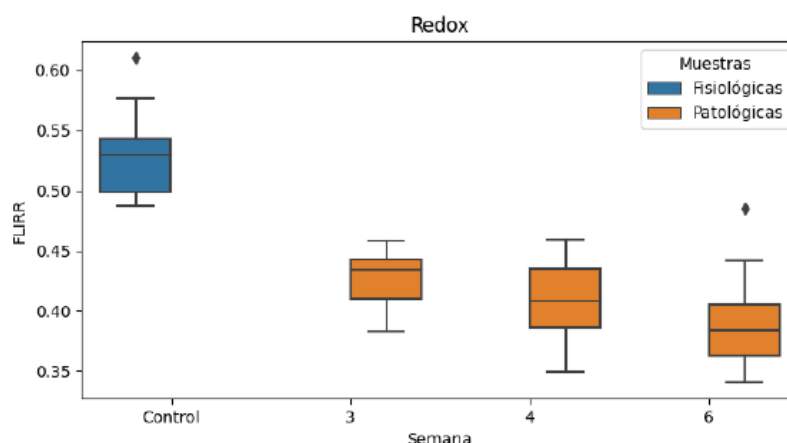


Figura 21: Diagrama de cajas del parámetro de FLIRR.

Para el parámetro FLIRR el ANOVA arrojó un $p\text{-value}$ de $1 \times 10^{-10} < 0.05$ con un tamaño de efecto grande de $0.7 > 0.14$. Estos valores permitieron rechazar H_0 , por lo cual se realizó la prueba de Tukey donde los resultados se observan en la tabla 2. En esta prueba se encontró que el parámetro p-Tukey es inferior a 0.05 entre el control y cada una de las semanas, por lo cual presenta una diferencia significativa entre sus medias.

Sin embargo, no hay evidencia suficiente para poder diferenciar entre las medias de las propias semanas entre sí, por lo que este parámetro es un buen indicador para diferenciar entre tejido fisiológico y patológico, pero no entre las muestras patológicas para estas semanas.

Tabla 2. Resultados prueba Tukey para FLIRR

A	B	mean(A)	mean(B)	diff	p-Tukey
3	4	0.396	0.381	0.015	7.88×10^{-1}
3	6	0.396	0.37	0.026	3.98×10^{-1}
3	Control	0.396	0.498	-0.102	1.63×10^{-6}
4	6	0.381	0.37	0.011	8.84×10^{-1}
4	Control	0.381	0.498	-0.118	5.78×10^{-9}
6	Control	0.37	0.498	-0.128	6.04×10^{-10}

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Análisis morfológico 3D

La cuantificación, caracterización morfológica 3D y análisis estadísticos, establecieron que los segmentos de fosas de las criptas de Lieberkühn estudiadas, de aproximadamente $60 \mu\text{m}$, presentarían mayor nivel de similitud en las etapas de tiempo cero y 2da semana de tratamiento. Sólo en dos (volumen e irregularidad) de los siete descriptores se hallaron diferencias significativas entre ambos puntos, y sólo en uno de los estudios experimentales. Con el transcurso del tiempo de tratamiento la variabilidad morfológica aumenta, ya que el comportamiento general observado en las magnitudes de esfericidad, compactibilidad, elongación e irregularidad indican que disminuyen, incrementando la planitud. En ambos estudios experimentales, la 4ta semana contiene las representaciones con mayor volumen y superficie, y en general, mayor variabilidad.

La relación entre los patrones de orificios de las criptas de Lieberkühn y la configuración 3D de las fosas se estableció y correlacionó mediante inspecciones visuales y mediciones de ancho y largo, reportadas en algunos artículos de investigación científica [24, 25]. Escasos informes proponen algoritmos para la obtención de mediciones 3D relacionadas al tamaño y forma de las fosas o criptas [26, 27]. De los estudios computacionales, Qi et al. [26] desarrollaron un algoritmo de cuantificación morfológica 3D utilizando imágenes de coloendoscopia de magnificación y OCT sobre muestras normales, adyacentes a cáncer pero con aparente normalidad, y malignas. La metodología de medición extrae el área, longitud del eje mayor, longitud del eje menor, excentricidad de la elipse que mejor ajusta al objeto y solidez para cada orificio de cada imagen 2D del volumen. Luego, la cuantificación final es originada a partir del conjunto de datos de cada orificio segmentado, siempre que su extensión a lo largo de la mucosa sea mayor a 60 μm . En base a ese concepto, el área no sería un parámetro directamente comparable al considerar un promedio de áreas de los orificios a lo largo de la cripta en su totalidad. Los parámetros restantes, excentricidad, solidez y rectitud, establecen que las representaciones normales serían menos irregulares en su superficie externa, más rectas y probablemente más circulares en el plano XY (si todas las estructuras analizadas tienen extensiones similares) que las consideradas neoplásicas. A su vez, la distorsión en la orientación de las criptas malignas sería aún más notorio. Por su parte, Furuwaka et al. [27] cuantificaron volumen y superficie tanto para la cripta como para su lumen de forma independiente. Dichas mediciones fueron llevadas a cabo en reconstrucciones de grosor de 3 μm de biopsias de regiones normales, en transición y patológicas a partir de un reducido número de pacientes. Se observó que los valores medios referentes tanto a criptas como lúmenes se incrementan con la transformación de la mucosa de normal a patológica. Sin embargo, el aumento entre transiciones de regiones es menor para las cuantificaciones de criptas que de lúmenes. Los datos denotan grandes variaciones entre muestras de diferentes pacientes como del mismo, incluso en las clasificadas como normales.

Hasta este punto, la interpretación de las mediciones 3D realizadas conjetura que las fosas de control, al tener menor volumen que lo supuesto, serían más estrechas que el modelo. Sin embargo, los valores de superficies similares indicarían que presentarían mayor irregularidad en su contorno, lo que podría afectar su planitud o rectitud. El tratamiento con AOM/DSS afecta inmediatamente el volumen de la fosa pero la superficie comenzaría a alterarse posteriormente, alcanzando sus máximos en la 4ta semana. En cuanto a la elongación, su magnitud se incrementa cuando el área del orificio se reduce en el plano XY y también puede aumentar o disminuir según la irregularidad de la morfología de la forma. Para fosas extremadamente elongadas en el plano XY, el valor disminuye debido a la reducción de la diferencia entre los radios del primer y segundo eje del elipsoide que lo ajusta. Por lo tanto, las fosas de la 4ta y 8va semanas tienden a exhibir una estructura 2D alargada, similar a la de los patrones de fosas neoplásicas. Por último, las fosas no neoplásicas se asocian a valores de irregularidad y planitud cercanos a 1, ya que sus volúmenes deberían ser similares al volumen del elipsoide de mejor ajuste y deberían contar con una superficie lisa y estar orientadas en línea recta. Ambos valores disminuyen y aumentan, respectivamente, con el incremento de la irregularidad de la superficie en las representaciones neoplásicas. Nuevamente, las fosas de la 4ta y 8va semanas presentaron una superficie más rugosa y también fueron menos rectas como podría anticiparse en la transición de la etapa no neoplásica

a la neoplásica. Finalmente, los valores de los parámetros cuantificados en las etapas avanzadas de la patología pueden deberse a la variación estructural de una fosa o a la cuantificación de dos o más fosas que se han fusionado durante el proceso. Esto puede observarse principalmente en algunas de las representaciones de la 4ta y 8va semanas de la figura 19.

En base a lo supuesto, con el fundamento de los datos recabados en los artículos publicados, se sintetiza:

- Las fosas de animales no tratados o pertenecientes a etapas iniciales del tratamiento con AOM/DSS (control y 2da semana) se caracterizaron, en general, por ser más tubulares, menos rugosas y más rectas que las de los puntos de tratamiento posteriores. Por lo tanto, pueden estar asociadas a fosas normales o no neoplásicas, mientras que las de etapas posteriores pueden estar relacionados con adenomas o incluso criptas cancerosas.
- A excepción de la irregularidad, todos los parámetros tienen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de control y las fosas de la 4ta semana. Durante y posteriormente a este punto, la configuración de las fosas se altera significativamente, con posibilidad de incrementar su grosor y elongación en el plano XY. Su superficie externa se ve afectada, extendiéndose a causa del incremento de irregularidad o rugosidad externa, lo que también incide en la rectitud de la orientación de las fosas.
- Sabiendo que la orientación de las criptas cambia con la progresión de la enfermedad [26], las estructuras de las criptas adyacentes a las regiones tumorales, o las de displasia temprana, tienden a variar en tamaño en el campo de visión, agrandándose, y a menudo elongándose y/o presentando bordes dentados en el plano de visualización [28]. Además, los lúmenes de las criptas aberrantes a veces aparecen en forma de hendidura, con incremento de sus dimensiones e irregularidad, y con orientaciones menos paralelas entre sí [26].
- De esta forma, se podría conjeturar que los puntos de muestra de la 4ta y 8va semanas pueden estar ligados a adenomas o posibles criptas cancerosas como consecuencia del incremento de rugosidad superficial y área de los orificios, así como de la reducción de rectitud.

Al suponer que los principales cambios morfológicos comienzan después de la 2da semana, considerando la relevancia de la 4ta semana en la transformación morfológica descrita, debería evaluarse la posibilidad de redefinir los puntos temporales para el análisis. A los fines de hallar características en etapas tempranas de la progresión del CCR, podría incluirse una etapa intermedia entre la 2da y 4ta semana, concluyendo el estudio en este punto.

Análisis metabólico

Con respecto a la microscopia del tiempo de vida de la fluorescencia FLIM, el objetivo general del trabajo fue analizar si esta microscopía puede ser utilizada como una herramienta de diagnóstico temprano de cáncer colorrectal. En los últimos años, se comenzó a ver una tendencia hacia el uso de la fluorescencia como técnica de diagnóstico de muchas patologías. Principalmente se destaca el uso de la autofluorescencia, ya que permite tener un método de diagnóstico in vivo, no invasivo, que brinda mucha

información de los tejidos, morfología celular, concentración iónica intracelular, contenido lipídico, entorno celular, las interacciones entre las propias células, etc [20, 29]. Sin embargo, a pesar de todas las ventajas de la autofluorescencia de los tejidos, las limitaciones en el uso de la intensidad de la fluorescencia como fuente de información, hizo que se comiencen a buscar otras características de la misma como alternativa. Entre algunas de estas características, surgió el tiempo de vida de la fluorescencia que ha demostrado una gran robustez ante todas estas limitaciones, por lo cual tienen un potencial enorme como técnica de diagnóstico de múltiples patologías [20].

Como se mencionó, hay distintas aplicaciones para la técnica de FLIM. Para el presente trabajo, resultó de gran interés la caracterización de tejidos a partir de su autofluorescencia, utilizada por ejemplo para detección de anomalías, como es el caso del cáncer. En este caso, una de las características más interesantes es la variación del metabolismo en células neoplásicas respecto a células normales, las cuales pueden detectarse a partir de las coenzimas NAD(P)H y FAD [21]. El NADH, NADPH (al tener espectros fluorescentes similares, se las considera juntos como NAD(P)H) y el FAD son coenzimas fluorescentes que participan en los distintos procesos del metabolismo, las cuales se encuentran en el citoplasma celular en forma libre o ligadas a proteínas. En células patológicas, aumenta el contenido de NAD(P)H libre respecto a NAD(P)H ligado a proteínas, como también aumenta el contenido de FAD ligado a proteínas, respecto al FAD libre. Como a través de FLIM, es posible identificar de la proporción entre estas coenzimas libres y ligadas a proteínas, su medición también permite identificar entre tejido normal y patológico [22].

Por otro lado, tanto el NAD(P)H como el FAD forman pares redox, pero con una característica importante. Mientras que el NAD(P)H es fluorescente en su forma reducida, pierde la fluorescencia cuando se oxida a NAD^+ . Por otro lado, el FAD es fluorescente en su estado oxidado (FAD^+), mientras que pierde su fluorescencia en estado reducido (FAD) [22]. Debido a que en las células neoplásicas predomina la glucólisis reductiva, respecto de la fosforilación oxidativa predominante en células normales, muchos trabajos intentaron utilizar la intensidad de fluorescencia para medir las concentraciones de las coenzimas antes mencionadas, para intentar identificar el tipo de metabolismo predominante, y así poder diferenciar tejidos normales de patológicos. Sin embargo, las limitaciones de la fluorescencia antes mencionadas provocó que los resultados no sean concluyentes.

La técnica de FLIM resultó ideal para superar estas limitaciones, ya que permite calcular esta relación redox, independientemente de la cantidad de NAD(P)H y FAD presente en las células y otros parámetros de adquisición e instrumental, a partir de la cantidad relativa de NAD(P)H ligado a proteínas, respecto del NAD(P)H libre, y la cantidad relativa de FAD libre, respecto a FAD ligado a proteínas. Esta relación fue la antes mencionada en resultados como FLIRR [22].

A partir del análisis de los resultados obtenidos, puede verse que hay varios parámetros que permiten diferenciar entre tejido fisiológico y patológico. Entre ellos, se encuentra los parámetros $a_1[\%]$ y $a_2[\%]$ (lo cual es lógico ya que $a_2[\%] = 100 - a_1[\%]$, por lo que son parámetros dependientes) tanto para el NAD(P)H como para el FAD, teniendo una mejor resolución para identificar el tipo de tejido para el caso del NAD(P)H, ya que en los parámetros *p-Tukey* entre el control y las semanas son más pequeños, indicando mayor diferencia entre sus medias.

Por otro lado, otro parámetro que permite identificar entre tejido fisiológico y patológico es a_1/a_2 , tanto para el NAD(P)H y el FAD, pero nuevamente considerando que $a_2 = 1 - a_1$ [%] (en este caso son valores absolutos y no relativos), se tiene que la relación $a_1/a_2 = a_1/(1 - a_1)$, por lo cual nuevamente es dependiente del parámetro a_1 , por lo que es lógico sea un buen para identificar el tipo de tejido. Sin embargo, el mejor parámetro que permite identificar entre tejido fisiológico y patológico es *FLIRR*, ya que permite que las medias entre el las muestras de control y cada una de las semanas difieren más, lo cual puede observarse tanto en los diagramas de cajas de la figura 21 y en los parámetros de Tukey, ya que para este parámetro los valores de *p-Tukey* son más chicos.

El parámetro *FLIRR* resulta muy interesante, ya que es el único que utiliza información tanto del NAD(P)H ligado a proteínas como del FAD ligado a proteínas. Además, se demostró que a medida que la evoluciona la patología, al menos hasta la semana 6 luego de la inducción, la proporción de NAD(P)H ligado a proteínas disminuye (se encuentra en el numerador de la expresión de *FLIRR* y la proporción de FAD ligado a proteínas aumenta (se encuentra en el denominador de la expresión de *FLIRR*, por lo que ambos efectos se suman, generando una mejor resolución para la identificación del tipo de tejido.

En otros tejidos, se ha demostrado que la relación redox o *FLIRR* permite identificar tejido cancerígeno de tejido normal, como es en el caso de Jo et al, donde analizan la técnica de FLIM como posible técnica de diagnóstico de cáncer oral [30]. En este trabajo, realizaron FLIM en biopsias de tejido normal, lesiones benignas y carcinoma en estadio inicial, y encontraron que no hay diferencias significativas entre *FLIRR* para el tejido normal respecto de las lesiones benignas, pero este parámetro disminuye para el carcinoma, respecto del tejido normal, al igual que lo encontrado en este trabajo para el colon. Otro resultado similar se obtuvo en el caso del pulmón, donde se utilizó el parámetro de *FLIRR* para comparar entre tejido normal y carcinoma de pulmón, obteniendo que el mismo disminuye para el caso del carcinoma, respecto del tejido normal. En el trabajo realizado por Wang et al, se utilizó FLIM para analizar el cáncer de pulmón. En este caso, reportaron el parámetro t_m disminuye en el tejido cancerígeno, respecto del tejido normal, tanto para el NAD(P)H como para el FAD [31]. En este trabajo, no se ha encontrado el mismo resultado, sin embargo, puede deberse al estadio de la patología. En el presente trabajo, se centró en el estadio temprano, y se encontró, que, en una primera instancia, tanto para NAD(P)H como para FAD, el parámetro t_m aumenta, pero luego de la semana 4, comienza a disminuir, por lo cual, puede que, en un periodo de tiempo posterior, disminuya a valores inferiores que la media para el tejido normal, y así coincida con los resultados encontrados por Wang et al [31].

A partir de toda la información reunida a lo largo del desarrollo del presente trabajo, ya sea desde la búsqueda bibliográfica como de los resultados propios obtenidos, podemos concluir que la microscopía de tiempo de vida de la fluorescencia es una potencial técnica para el diagnóstico temprano de cáncer colorrectal.

Resumiendo, la metodología propuesta permitió cuantificar cambios morfológicos y metabólicos, producidos en tejidos no patológicos y patológicos derivados de la implementación de un modelo murino de inducción de CCR a partir de ciclos de AOM/DSS. Los objetivos establecidos inicialmente fueron alcanzados, y en conjunto, condujeron a la verificación de la hipótesis formulada. Dicha hipótesis conjeturó que la morfología 3D de las fosas de las criptas de Lieberkühn y el metabolismo de la mucosa de colon presentan diferencias entre muestras de tejido epitelial patológico y no patológico,

como también entre las etapas de progresión del CCR, y su verificación fue llevada a cabo ante la particularidad de la reconstrucción de un segmento de las fosas y no de su volumen total.

A partir de los resultados morfológicos 2D y 3D obtenidos, y análisis estadísticos asociados, se caracterizó la morfología de los orificios de las fosas y de un segmento de las mismas. En ambas situaciones, 2D y 3D, se logró definir a la 4ta semana como el punto de tiempo en el cual, en las condiciones del modelo utilizado, se manifestarían la mayoría de los cambios de forma en los orificios/fosas. Además, la caracterización 3D posibilitó asociar a las fosas de diferentes instantes de tiempo a lúmenes de criptas normales, no neoplásica o neoplásicas.

REFERENCIAS

- [1] Organización Mundial de la Salud (2014). Informe sobre la salud en el mundo 2014.
- [2] Mincyt (2022). Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Argentina, <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad>.
- [3] Celi A, Merrill-Skoloff G, Gross P, Falati S, Sim DS, Flaumenhaft R, Furie BC, Furie B (2003). Thrombus formation: direct real-time observation and digital analysis of thrombus assembly in a living mouse by confocal and wide field intravital microscopy. *J Thromb Haemost* 1: 60-68.
- [4] De Robertis M, Massi E, Poeta ML, Carotti S, Morini S, Cecchetelli L, Signori E, Fazio VM (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog* 10: 9. doi: 10.4103.
- [5] Bianchi M, Adur J, Izaguirre MF, Viale S, Cesar CL, Casco VH (2013). Endothelin-2 differential expression in normal and early-stages of colon cancer development. *J Cancer Therapy* 4: 26-33.
- [6] Bianchi M, Adur J, Ruff SY, Izaguirre MF, Carvalho HF, Cesar CL, Casco VH (2014). Mouse colorectal cancer an early detection approach using nonlinear microscopy. *Biomed Mater Eng* 24: 3419-3426.
- [7] Adur J, Carvalho HF, Cesar CL, Casco VH (2014). Nonlinear optical microscopy signal processing strategies in cancer. *Cancer Inform* 13: 67-76.
- [8] Barbosa GD, Borgonovo JR, Izaguirre MF, Casco VH, Adur JF (2009). Microscopia de fluorescencia aplicada al diagnóstico de tejidos tumorales. 10° Congreso Interamericano de Microscopía Electrónica (Interamerican Committee of Societies for Electron Microscopy, CIASEM 2009) y el 1er Congreso de la Sociedad Argentina de Microscopía (SAMIC 2009), Rosario, Argentina.
- [9] Adur J.F., Balducci F.D., García J.C., Vilá J.F., Izaguirre M.F. y Casco V.H. (2001) Observación Tridimensional. La nueva era en la microscopía de fluorescencia. *Ciencia Hoy* 11: 22-31.
- [10] Regueiro CR (2005). AGA Future Trends Committee report: Colorectal cancer: a qualitative review of emerging screening and diagnostic technologies. *Gastroenterology* 129:1083-103.
- [11] Conchello JA, Lichtman JW (2005). Optical sectioning microscopy. *Nat Methods*; 2:920-931.

- [12] Diaz-Zamboni J., Adur J., Casco V.H. (2004) Implementación de un algoritmo basado en el Método de Regulación Lineal. Su aplicación en la reconstrucción tridimensional de secciones ópticas. VII Congreso Internacional de Métodos Numéricos en Ingeniería y Ciencias Aplicadas. Venezuela.
- [13] Adur J, Diaz-Zamboni J, Vicente N, Izaguirre MF, Casco VH. Digital Deconvolution Microscopy: Development, Evaluation and Utilization in 3D quantitative studies of E-cadherin expression in skin of Bufo arenarum embryos. Modern Research and Educational Topics in Microscopy. Vol II. Techniques. 906-916 (2007).
- [14] Erbes LA, Zeitoune A, Bianchi M, Ruff SY, Casco VH, Adur J. (2018). "Development of a segmentation method for crypts of Lieberkühn detection using autofluorescence colon images". Revista Argentina de Bioingeniería. Vol. 22 (2): 62-66.
- [15] Erbes LA, Zeitoune AA, Torres HM, Casco VH, Adur J (2019). Morphological characterization of colorectal pits using autofluorescence microscopy images. Arch. Gastroenterology.
- [16] Tanaka T (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. J. Carcinog. 8:1-19.
- [17] GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS, Octava edición. Washington: the national academies press, 2011.
- [18] Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., and Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. Cancer Science, 94(11):965-973.
- [19] Corpet, D. E. and Pierre F, (2003). Point: From Animal Models to Prevention of Colon Cancer. Systematic Review of Chemoprevention in Min Mice and Choice of the Model System. Cancer Epidemiol. Prev. Biomark., 12(5): 391-400.
- [20] Chen L.C. (2013) Fluorescence lifetime imaging microscopy for quantitative biological imaging, Methods in Cell Biology.
- [21] Trautmann S. (2013). Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) in Confocal Microscopy Applications: An Overview. PicoQuant GmbH.
- [22] Becker W. (2018) Metabolic Imaging with the DCS-120 Confocal FLIM System: Simultaneous FLIM of NAD(P)H and FAD., [En línea]. Available: <https://www.becker-hickl.com/wp-content/uploads/2018/12/nadh-fad-flim-v05.pdf>.
- [23] Becker&Hickl (2018). FLIM Systems for Zeiss LSM-710 / 780 / 880, [En línea]. Available: <https://www.photonicsolutions.co.uk/upfiles/FLIMSystemsforZeissLSM710780880LG30Apr18.d>.
- [24] Kudo, S., Hirota, S., Nakajima, T., Hosobe, S., Kusaka, H., Kobayashi, T., Himori, M., and Yagyuu, A. (1994). Colorectal tumours and pit pattern. Journal of Clinical Pathology, 47(10):880-885.
- [25] Tamura, S., Furuya, Y. C., Tadokoro, T., Higashidani, Y., Yokoyama, Y., Araki, K., and Onishi, S. (2002). Pit pattern and three-dimensional configuration of isolated crypts from the patients with colorectal neoplasm. Journal of Gastroenterology, 37(10):798-806.
- [26] Qi, X., Pan, Y., Hu, Z., Kang, W., Willis, J. E., Olowe, K., Sivak, M. V., and Rollins, A. M. (2008). Automated quantification of colonic crypt morphology using integrated microscopy and optical coherence tomography. Journal of Biomedical Optics, 13(05):1-11.
- [27] Furukawa, H., Inoue, F., Miyake, N., Moriyasu, T., Moriti, H., and Saiga, T. (2004). Three-dimensional reconstruction of the mucosa from sequential sections of biopsy specimens of patients with ulcerative colitis: Relationship between crypt structure and vascular architecture. Digestive Endoscopy, 16(2):107-112.

- [28] Prieto, S. P., Reed, C. L., James, H. M., Quinn, K. P., and Muldoon, T. J. (2019). Differences in colonic crypt morphology of spontaneous and colitis-associated murine models via second harmonic generation imaging to quantify colon cancer development. *BMC Cancer*, 19(428):1–19.
- [29] Andersson-Engels S, Klinteberg C, Svanberg K, Svangber A (1997). In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics. *Physics in Medicine & Biology*.
- [30] Jo JA, Cheng S, Cuenca-Martinez R, Duran-Sierra E, Malik B, Ahmed B, Maitland K, Cheng YL, Wright J, Reese T. (2018) Endogenous Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) Endoscopy For Early Detection Of Oral Cancer And Dysplasia. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*.
- [31] Wang, M., Tang, F., Pan, X., Yao, L., Wang, X., Jing, Y., Ma, J., Wang, G., & Mi, L. (2017). Rapid diagnosis and intraoperative margin assessment of human lung cancer with fluorescence lifetime imaging microscopy. *BBA Clinical*.

PID 6212

Denominación del Proyecto

Reconstrucción óptica tridimensional de la mucosa murina con resolución celular. Utilidad para la evaluación del cáncer colorrectal

Director

Adur Javier Fernando

Codirectora

Izaguirre, María Fernanda

Unidad de Ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Ingeniería

Contacto

javier.adur@uner.edu.ar

Cátedra/s, área o disciplina científica

Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LMAE)

Integrantes del proyecto

Docentes UNER: Galetto, Carolina Daniela; Erbes, Luciana Ariadna; Zeitoune, Angel

Fechas de iniciación y de finalización efectivas

03/03/2021 y 22/01/2024

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 190/24 (28/06/2024)