

PID 6116

Estudios Moleculares y Celulares del Sistema de Endotelinas en Cáncer Colorectal

M. Bianchi, S. Ruff, S. Viale, M.F. Izaguirre, V.H. Casco y J. Adur

AUTORES: Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LMAE) y Radiaciones No Ionizantes (RNI). Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina

CONTACTO: jadur@bioingenieria.edu.ar

Resumen

En el presente proyecto se estudió el rol que cumple el sistema de endotelinas en el tracto digestivo murino. Previa verificación de la localización del sistema en condiciones fisiológicas normales, se estudiaron los cambios en el patrón de expresión de los péptidos y sus receptores durante el desarrollo de un modelo de cáncer colo-rectal murino inducido por azoximetano.

La caracterización de las diferentes etapas del desarrollo de cáncer colo-rectal se realizó utilizando técnicas de anatomía patológica clásicas, de inmunohistoquímica y de microscopia óptica no lineal. Estos datos morfológicos fueron correlacionados con los niveles de expresión de los ARNm de los péptidos y sus receptores usando técnicas de PCR semi-cuantitativa. Asimismo, las evidencias morfológicas obtenidas en los animales normales y los inducidos al desarrollo tumoral, se correlacionaron con índices de auto-fluorescencia obtenidos por microscopia de desconvolución digital; el cual fue determinado registrando la fluorescencia endógena proveniente de la superficie epitelial del colon. Además de dilucidar los posibles roles del sistema Endotelinas en un modelo murino de cáncer colo-rectal, con el presente proyecto se obtuvieron parámetros cuantitativos e indicadores, que podrían utilizarse para evaluar el proceso cancerígeno y como un posible método de diagnóstico temprano.

Palabras clave: endotelinas, modelo murino, cancer colorectal, diagnóstico temprano

Introducción

Se ha demostrado que el sistema endotelinas posee un rol relevante en un amplio rango de patologías. La endotelina 1 (ET-1) actúa durante el crecimiento y progresión de una amplia variedad de tumores. En estudios *in vitro*, la ET-1 actuando vía el receptor ETA, es un inductor mitogénico para células cancerosas colo-rectales. Se ha verificado que en humanos se produce una elevación significativa de la expresión de ET-1 en el 80% de los cánceres de colon (Grant y col., 2003).

Se ha postulado que el VIC/ET-2 localizado principalmente en la superficie de las células epiteliales del colon puede ser secretado por células apoptóticas, ejerciendo así una función de señalización de naturaleza quimioattractante para células fagocíticas como los macrófagos; o alternativamente, incrementa la onda apoptótica al sensibilizar los receptores ETB (Lauber y col., 2003). La distribución del péptido VIC/ET-2 en colon de animales sometidos a la acción de DSS para inducir el desarrollo de un proceso de colitis ulcerosa se incrementó. En tal sentido, se hipotetizó que un efecto similar debería ocurrir ante las injurias producidas por células tumorales. Para corroborar la misma, se analizó el rol de ET-2, ya que es el péptido menos estudiado y por ende el menos conocido, del sistema de las endotelinas. El estudio utilizó asimismo a ET-1 y los receptores ETA y ETB para analizar posibles diferencias en los mecanismos de acción de ambas moléculas.

Se utilizó el colon murino como modelo experimental, dado que permite estudiar las células epiteliales en sus diferentes estados de proliferación y diferenciación, ya que éstos dependen de su posición en la cripta. El CCR se indujo a través de la aplicación subcutánea de un derivado de 1,2-dimetilhidrazina, el Azoximetano (AOM) seguido de la administración oral de DSS. Este modelo, permitió discriminar la formación de pólipos, los que constituyen cambios morfológicos tempranos típicos, que preceden el desarrollo del cáncer, así como la formación de focos de criptas aberrantes.

Además de la justificación anterior del modelo, trabajar sobre la patología específica de cáncer colorectal, es de gran importancia por la gran cantidad de casos que se han reportado en los últimos años. La incidencia en la Argentina es altísima; alcanzando cifras similares a las de los Estados Unidos, Japón, Canadá y Europa occidental, que son los países con mayor incidencia de la enfermedad (Jemal y col., 2011). Una de las características más importantes del CCR es que la evolución se produce sin síntomas durante un largo tiempo, lo que la hace una enfermedad ideal para el desarrollo de estrategias preventivas. Cuando produce síntomas es porque las lesiones están muy avanzadas, por lo que el pronóstico del paciente depende del estadio en el que se lo trate. Aunque la detección temprana de la enfermedad, es decir, cuando las lesiones son incipientes, garantiza más de un 90% de supervivencia. Actualmente, apenas el 10% de los casos se detecta tan precozmente. Con el objetivo de analizar una nueva modalidad tecnológica de diagnóstico, en el presente proyecto, en paralelo al análisis de las endotelinas se realizó un análisis cuantitativo y cualitativo de la auto-fluorescencia y el colágeno en cada uno de los cambios morfológicos que se suceden hasta el desarrollo del CCR. El poder correlacionar estos valores con los cambios en el epitelio o estroma del colon mientras avanza el proceso de inflamación podría constituir una forma de diagnóstico que no ha sido explorada en nuestro país.

Endotelinas en intestino normal

Primeramente, se analizó la expresión génica del sistema endotelinas en los distintos segmentos del tracto intestinal (Duodeno, Jejunio, Íleon, Colon y Recto) por PCR en tiempo real y su localización celular se completó con los estudios de inmunofluorescencia. Resumiendo los resultados obtenidos por RT-PCR, se determinó que la expresión génica de la ET-2/VIC supera a la de ET-1 en duodeno, jejunio e íleon, aunque sólo alcanzan valores significativos en este último segmento. A nivel del colon y el rec-

to, los niveles de ambos péptidos no muestran diferencias significativas. Por su parte, el receptor ET-A exhibe mayores niveles de expresión que el receptor ET-B tanto en colon como recto, aunque sólo en este caso los niveles son significativos. A nivel del intestino delgado, la expresión de ET-B fue superior, aunque esta sólo es estadísticamente significativa en el íleon (figura 1).

En relación a la distribución tisular, el péptido ET-2/VIC se encuentra principalmente localizado en las células de la mucosa epitelial. En el duodeno e íleon, la señal resulta más intensa en las células próximas a la membrana basal, que en el borde apical. Por el contrario, en el colon, la señal es más intensa sobre el borde apical que en la membrana basal. Contrastando con esta distribución diferencial de VIC/ET-2, se verificó que ET-1 está uniformemente distribuida en las células epiteliales a lo largo del eje de la vellosidad intestinal (figura 2). El receptor ET-A exhibe una distribución uniforme en la capa mucosa y en la muscular. Por el contrario, ET-B mostró una distribución diferencial en la mucosa, en las células de la vellosidad intestinal, en las de las criptas y en las del estroma en la lámina propia. Un hecho destacable es que en las vellosidades la localización es nuclear. Debido al gradiente de distribución observado para el péptido ET-2/VIC y dado el rol postulado para el sistema endotelinas en estas estructuras; nuestro grupo propuso que ET-2/VIC participaría como un factor paracrino involucrado en el control diferencial de la permeabilidad y de las propiedades contráctiles de las vellosidades. Dichas funciones serían llevadas a cabo en forma cooperativa con la ET-1 [Bianchi y col., 2012].

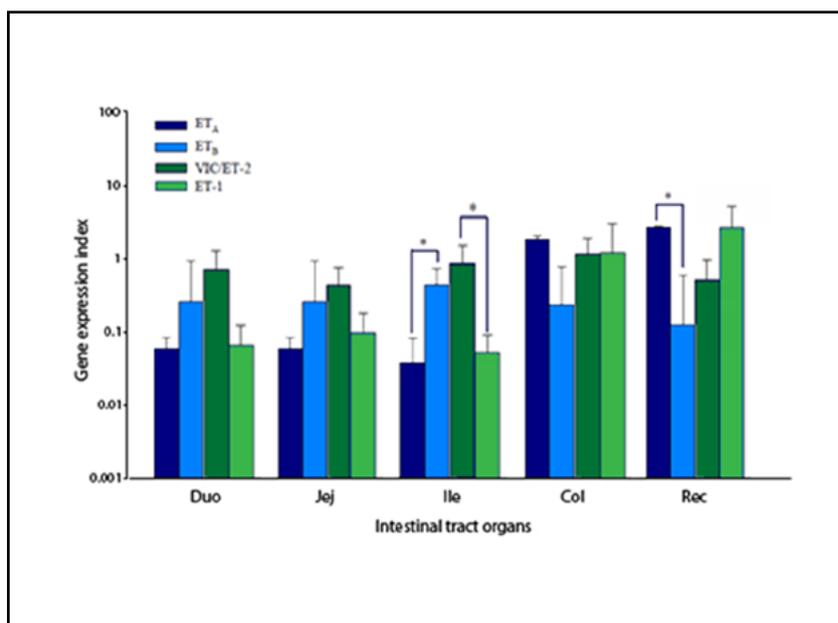


FIGURA 1. Expresión génica de los receptores ET-A y ET-B y los péptidos ET-2/VIC y ET-1 en diferentes segmentos del tracto intestinal. Los índices de expresión génica fueron normalizados con el gen GAPDH. Las barras representan el valor medio y su correspondiente desvío estándar (n=4). Las diferencias estadísticamente significativas son indicadas con asterisco (*) ($p < 0,05$)

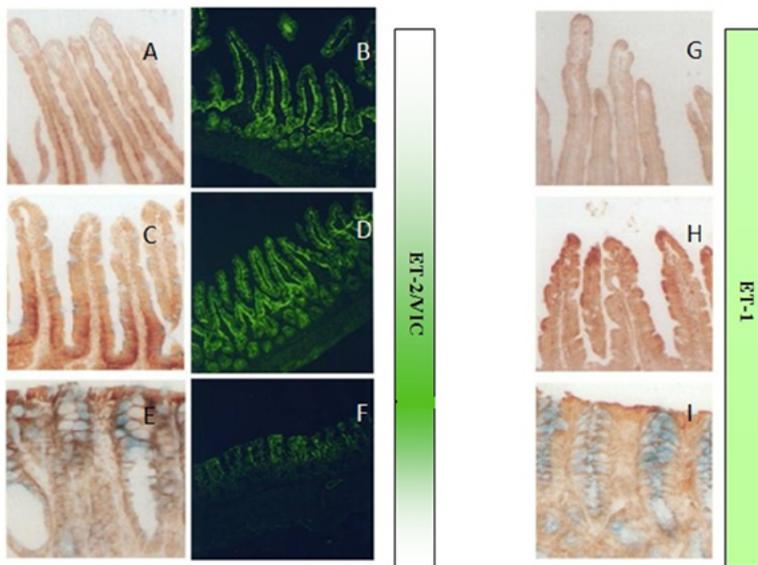


FIGURA 2. Inmunolocalización de los péptidos ET-2/VIC y ET-1 a lo largo del eje de la vellosidad y a lo largo del eje duodeno-colon. Izquierda: Inmunoreactividad de ET-2/VIC. A) duodeno, B) jejunó, C-D) íleon y E-F) colon. Derecha: Inmunoreactividad de ET-1. G) duodeno, H) íleon e I) colon

Modelo murino de cáncer colorectal

Para el desarrollo del bioensayo se acondicionó el bioterio de la FI-UNER de forma tal que los animales pudiesen completar los tiempos experimentales adecuadamente. En la semana 20 post-inyección, por el avance de la patología, las condiciones de los animales en la mayoría de los casos era muy crítica; por lo que fue fundamental extremar las condiciones ambientales y de cuidado en el mencionado recinto. En la figura 3 se observa un esquema del procedimiento utilizado en el bioensayo.

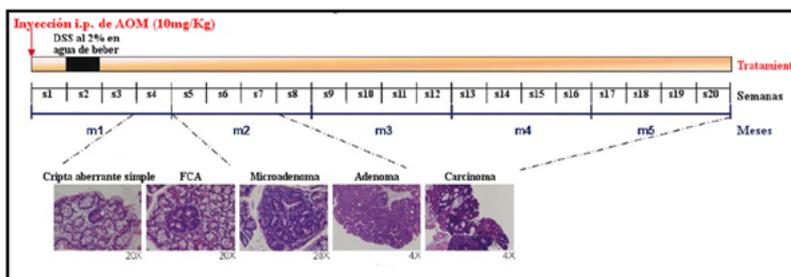


FIGURA 3. Esquema del modelo de inducción del CCR de Tanaka y colaboradores (2003), adaptado de De Robertis y colaboradores (2011). AOM: Azoximetano, DSS: Dextran Sulfato de Sodio, FCA: Foco de Cripta Aberrante

En animales sanos la superficie de la mucosa colónica exhibió una estructura plana con criptas separadas por estroma. El epitelio columnar superficial se encontró intacto sin erosiones con un contenido normal de mucina en las células caliciformes. Las criptas se visualizaron como estructuras individuales, no ramificadas, alcanzando la muscular de la mucosa. A través de todo el espesor de lámina propia, pudieron observarse linfocitos aislados o formando acúmulos o folículos linfoides (Figura 4a). Como puede observarse en la Figura 4 (a y b), estas estructuras se distribuyen tanto en la mucosa

como la submucosa. En la Figura 4c se muestran células del plexo mientérico, el cual se localiza entre las capas circular y longitudinal de la muscular propia. En el modelo de CCR, (Figura 4d), la inyección de AOM se consideró como día inicial del experimento. A los pocos días del tratamiento con DSS, los ratones mostraron indicios de inflamación intestinal, entre ellos diarrea y sangrado (Figura 4f). En la Figura 4d se muestran imágenes macroscópicas de intestinos gruesos extraídos tanto de los animales control, como inducidos con AOM/DSS obtenidos a las semanas 4, 8, 16 y 20 posteriores a la inyección de AOM. Los tumores se desarrollaron exclusivamente en el colon distal (*), extendiéndose hacia el recto y raramente hacia el colon proximal en las últimas semanas del experimento.

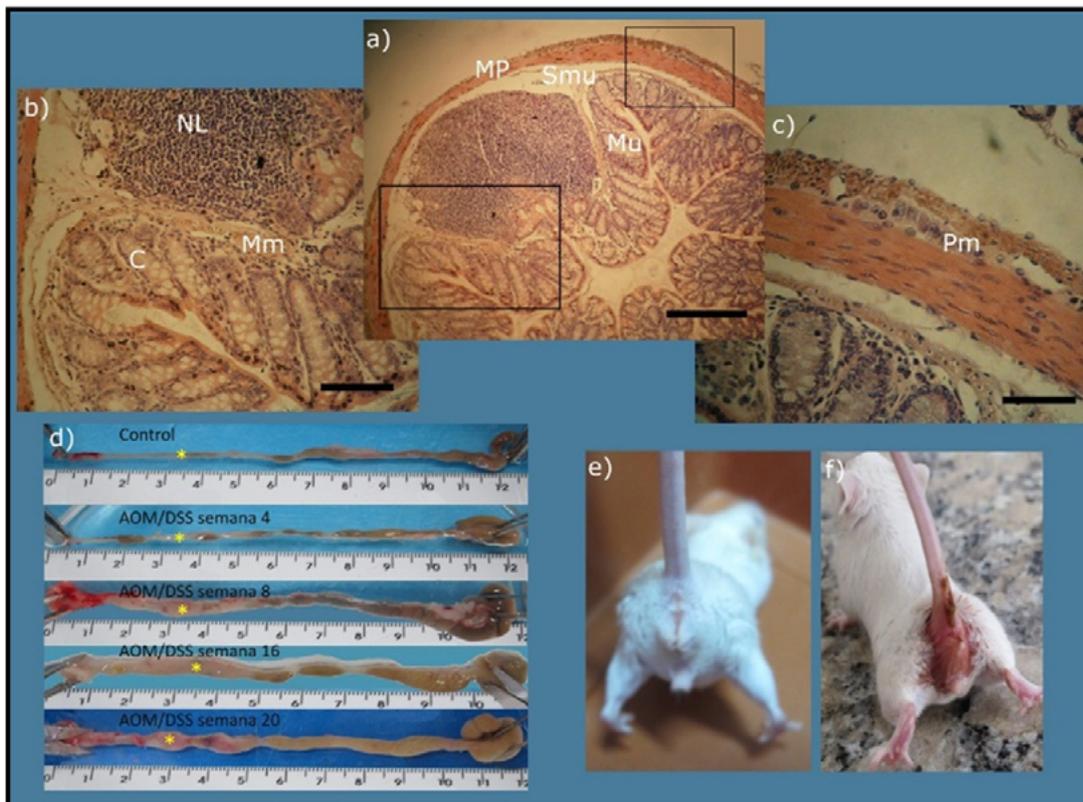


FIGURA 4. a) Corte transversal de colon de ratón sano, teñido con E&H. Las regiones rectangulares fueron tomadas a mayor aumento en las imágenes b y c. d) Intestino grueso (de derecha a izquierda ciego, colon proximal, colon distal, recto y ano) de ratón (desde arriba hacia abajo) sano, tratado con AOM/DSS a la semana 4, 8, 16 y 20 del experimento. e) Ratón Balb/c sano. f) ratón del grupo experimental tratado con AOM/DSS a la tercera semana de iniciado el experimento, se observa diarrea y sangrado anal. Barra: 100µm. NL: nódulo linfático, Mm: muscular de la mucosa, C: cripta, MP: muscular propia, Smu: submucosa, Mu: mucosa, Pm: plexo mientérico

En las tinciones histológicas de E&H (Figura 5) pudimos observar la progresión del cáncer colorectal en el modelo murino de AOM/DSS. A continuación, se describen resumidamente las características histológicas observadas durante el desarrollo del CCR. En la semana 4 post inducción, figura 5 (A), se observaron regiones afectadas con displasias de bajo grado (la mayoría de los núcleos conservan su polarización, flecha de la izquierda), además fueron identificadas figuras de criptas fusionadas (flecha de la derecha) e invasión linfocitaria. En la semana 8 post inducción, figura 5 (B) se observó regiones con displasias de alto grado (flecha) combinadas con zonas de abundante invasión linfocitaria. En la

semana 16 post inducción, figura 5 (C), se observaron regiones con carcinomas intramucosos (flecha de la derecha) y además invasiones los tallos de los adenocarcinomas pedunculados (flechas de la izquierda). En la semana 20 post inducción, figura 5 (D), se observó la presencia de carcinomas intramucosos con altamente displásicos (flecha de la derecha), además se observaron zonas con la llamada “necrosis sucia”, donde el lumen glandular se colma generalmente de una substancia mucosa de marcada eosinofilia, de alta densidad, conteniendo residuos nucleares y celulares (flecha de la izquierda). Estas características morfológicas son indicativas de posibles metástasis (De Robertis, 2011).

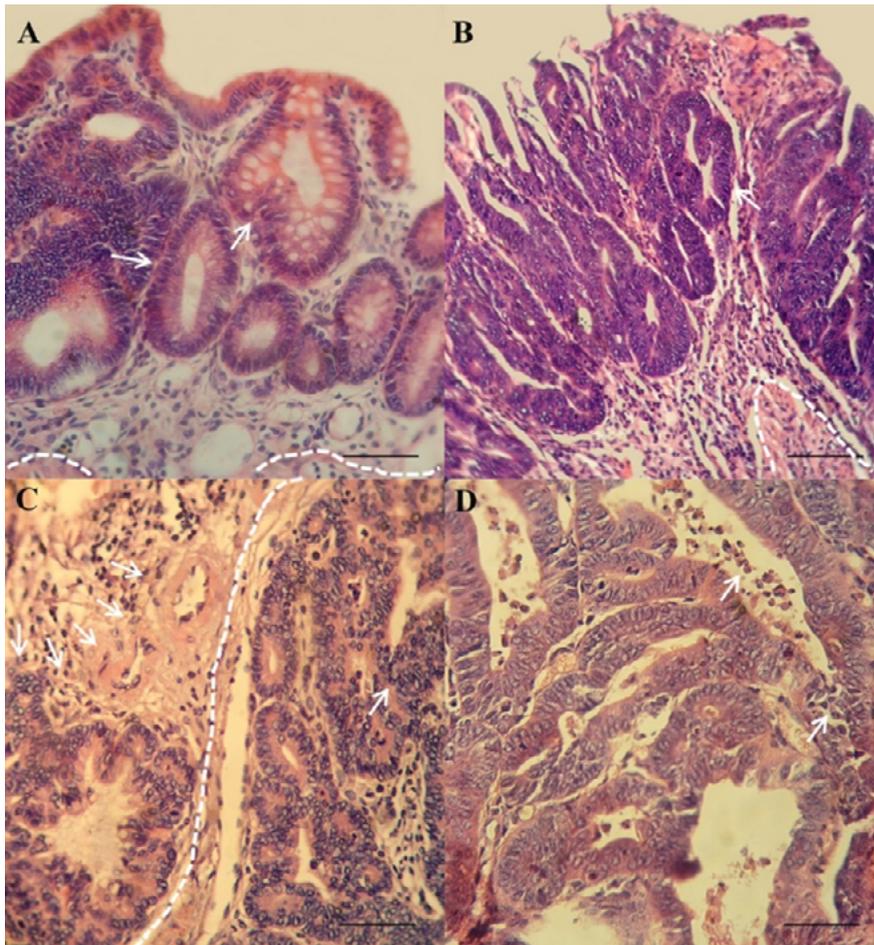


FIGURA 5. Imágenes representativas de H&E obtenidas en las distintas etapas de progresión del CCR. (A) Semana 4 post inducción; (B) Semana 8 post inducción, (C) Semana 16 post inducción y (D) Semana 20 post inducción. Las líneas punteadas identifican la posición de la muscular de la mucosa. Barra: 50 μ m

Las secciones teñidas con H&E se clasificaron según el grado de displasia predominante, las características de la lesión, su descripción histológica, su grado en el sistema TNM (Tumor Nódulo Metástasis), según la coloración con la técnica PAS/AB en la lesión y en la zona normal adyacente a la lesión y por último se dio su diagnóstico. En la tabla 1 se resumen los siguientes datos: en la semana 4, el 40% de los ratones tratados presentaron carcinoma *in situ* (el 20% de ellos presentó carcinomas *in situ* y el 20% sólo displasia leve con inflamación y cambios reactivos crípticos). En la semana 8 del experimento el 100% de los ratones presentó CIM, todos con graduación T₀ en el sistema TNM. La

tinción de PAS/AB en la zona de la lesión dio negativa en el 100% de los casos en semana 4, mientras que en la semana 8, el 80% de las lesiones fueron negativas para PAS y en el 80% fueron negativas para AB. Éste dato estaría indicando la ausencia de mucopolisacáridos en las lesiones, mientras que en la zona normal, adyacente a las mismas, se observa un predominio de la coloración de AB, lo que indicaría que predominan los mucopolisacáridos ácidos en el ambiente tumoral.

TABLA 1. Clasificación y Diagnóstico de las muestras de H&E

	Displasia	Características	Descripción histológica	TNM	PAS/AB lesión	PAS/AB ambiente	Diagnóstico
Semana 4	alto grado	lesión plana	tubular	To	-/-	-/+++	adenocarcinoma intramucoso plano tubular
	alto grado	lesión sésil	tubular	To	-/-	-/+++	adenocarcinoma in situ sesil tubular
	alto grado	lesión sésil	tubular	To	-/-	-/++	adenocarcinoma intramucoso sésil tubular
	alto grado	lesión plana	tubular	To	-/-	+/+++	adenocarcinoma intramucoso plano tubular
	bajo grado	no lesión	criptas reactivas	To		++/- -	displasia leve con inflamación crónica y cambios reactivos crípticos
Semana 8	alto grado	lesión plana	tubulovelloso	To	-/-	-/+	adenocarcinoma intramucoso plano tubulovelloso
	alto grado	lesión plana	tubular	To	-/-	+/+++	adenocarcinoma intramucoso plano tubular
	alto grado	lesión pedunculada	tubular	To	-/-	+/+	adenocarcinoma intramucoso pedunculado tubular
	alto grado	lesión sésil	tubular	To	-/+	-/+++	adenocarcinoma intramucoso sésil tubular
	alto grado	lesión plana	tubular	To	+/-	+/+++	adenocarcinoma intramucoso plano tubular

Referencias: (-) ausencia de coloración, (+) coloración escasa, (++) coloración media, (+++) coloración abundante.

Distribución celular de las ETs en el cáncer colorectal

En la mucosa del colon sano, ET-2 tuvo localización citoplásmica dentro de las criptas de Lieberkühn, en las células columnares. En colon proximal la marca se encontró dispersa, pudiendo observarse la mayoría de las veces en la base de las criptas (tercio inferior), otras veces de manera homogénea a lo largo del eje de la cripta (Figura 6 control CP) y algunas veces en la superficie colónica (tercio superior). En colon distal en cambio, la marca se localizó exclusivamente en el tercio inferior (Figura 6 control CD). En algunas ocasiones se observaron también células inmunes marcadas.

En la S4 se observó la misma marca citoplasmática en las criptas menos afectadas por la patología y en algunas criptas displásicas. En la S8, la localización de ET-2 pudo distinguirse aún en algunas criptas displásicas y en microadenomas, siendo difusa e imperceptible a medida que avanzó la patología (S16 y 20) (Figura 6 S4, S8, S16 y S20).

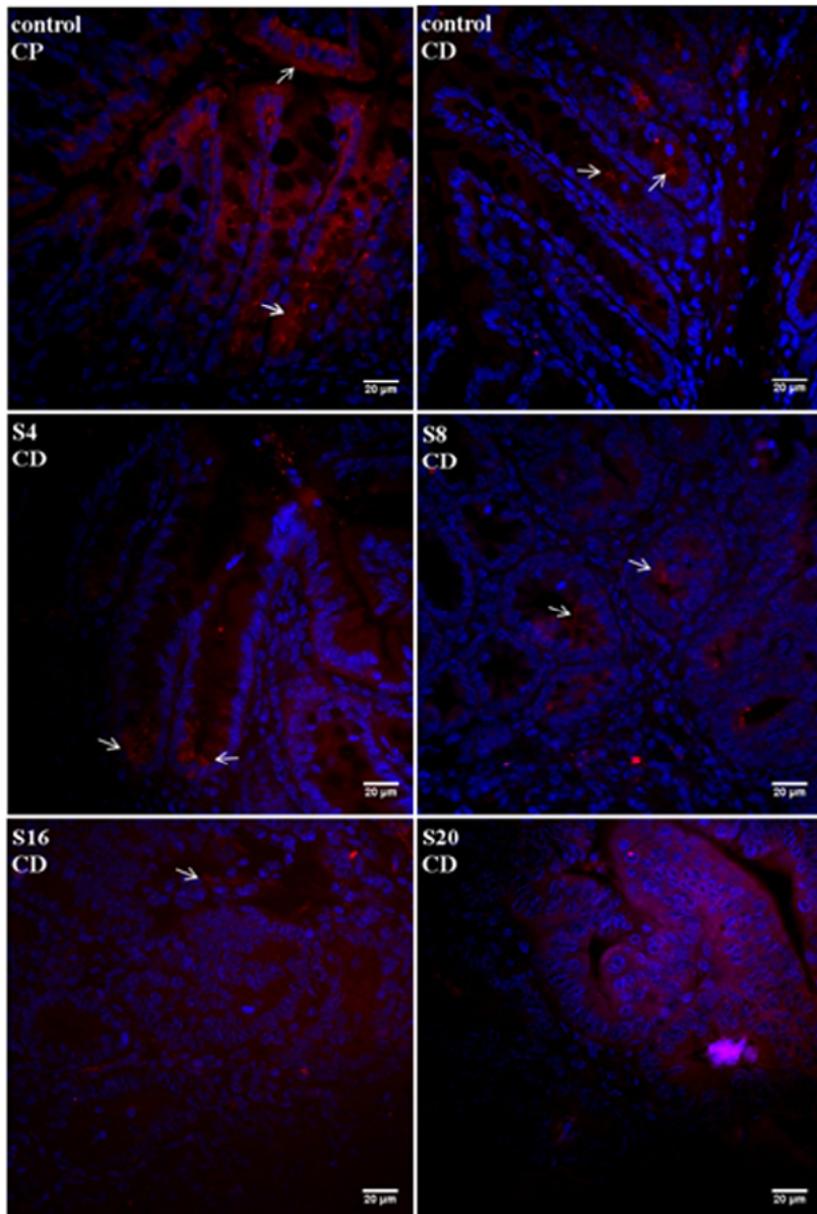


FIGURE 6

Tanto en colon proximal como distal la marca de ET-1 tuvo una amplia distribución en distintos tejidos del colon, poniendo en evidencia el pleiotropismo de la hormona. La marca se localizó en la capa mucosa tanto en las criptas de Lieberkühn donde se localizó en citoplasma y en ocasiones en los núcleos celulares, como también en el estroma (lámina propia) ubicándose principalmente en la membrana basal que recubre las criptas, probablemente en los fibroblastos subepiteliales y también en células linfoides (Figura 7 control CP y CD). En la submucosa ET-1 localizó en vasos sanguíneos

(Figura 7 control CP). Tanto en la S4, S8, S16 y S20 la marca fue citoplásmica en células epiteliales displásicas en focos de criptas aberrantes, microadenomas y adenocarcinomas, también se observó marca en linfocitos infiltrantes (Figura 7).

El receptor de Endotelinas ETA localizó tanto en colon proximal como en colon distal en citoplasma de células de las criptas de Lieberkühn, principalmente en el tercio inferior de las mismas (Figura 8 control CP y CD). También se observó marca en algunas células linfoides, en vasos sanguíneos y en algunas ocasiones en la capa muscular y plexo mientérico (imagen no mostrada). El receptor ETA se expresó en células normales y cancerosas. En la Figura 8 puede observarse la amplia localización del receptor en el citoplasma de linfocitos infiltrantes en un FCA (Figura 8 S4), y en la misma figura en la S8 se observa marcación en linfocitos infiltrantes en el tallo de un microadenoma pedunculado (Figura 8 S8). A medida que avanza la patología, se lo encuentra frecuentemente en células del sistema inmune (Figura 8 S16) y en las zonas necróticas asociadas a los tumores (Figura 8 S20).

La localización del receptor ETB fue casi exclusivamente nuclear tanto en colon proximal como en colon distal (Figura 9 control CP y CD), aunque también se pudieron observar algunos núcleos de linfocitos y de células musculares marcados (imagen no mostrada). En la patología la marcación también fue nuclear en las células del cáncer y en algunas fibras musculares (Figura 9 S4, S8, S16 y S20). Lo descrito en los párrafos anteriores se presenta en las siguientes figuras.

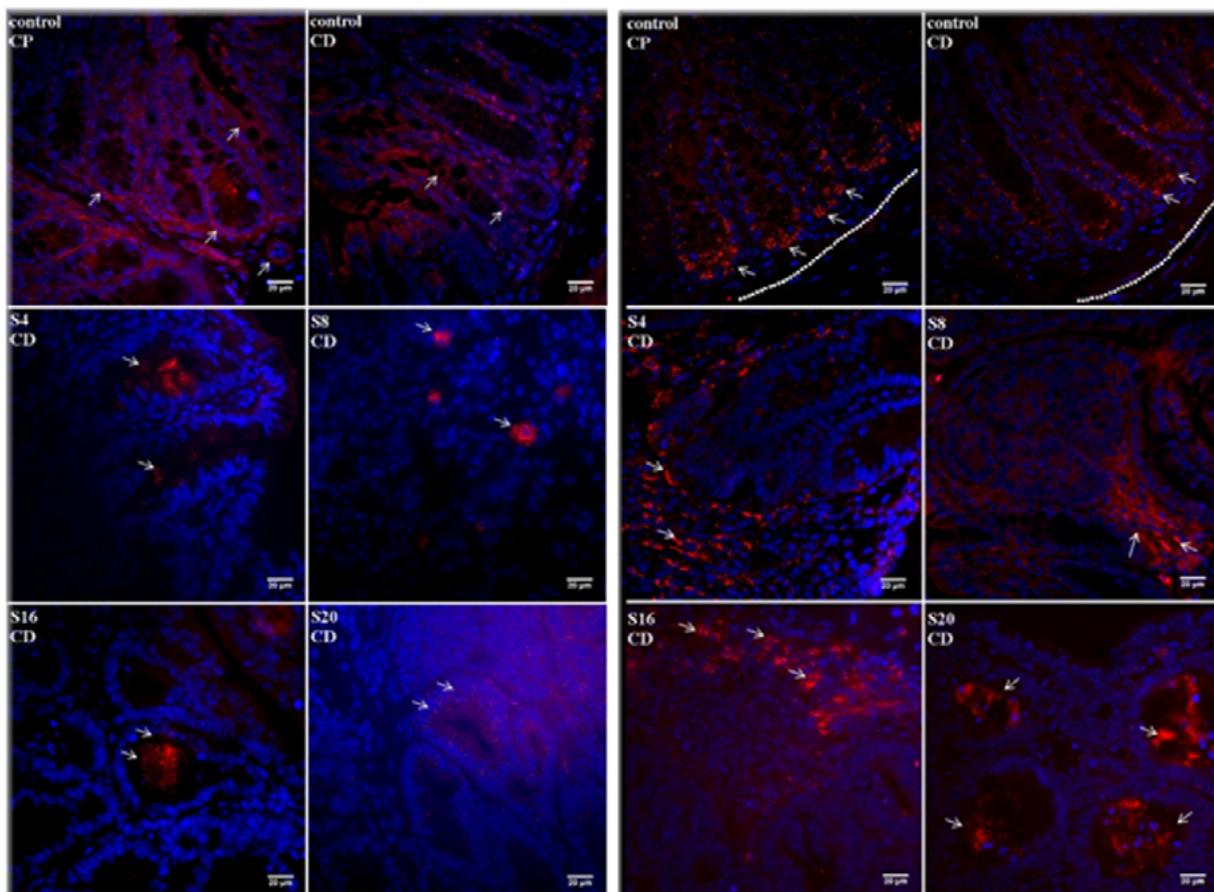


FIGURE 7 Y 8

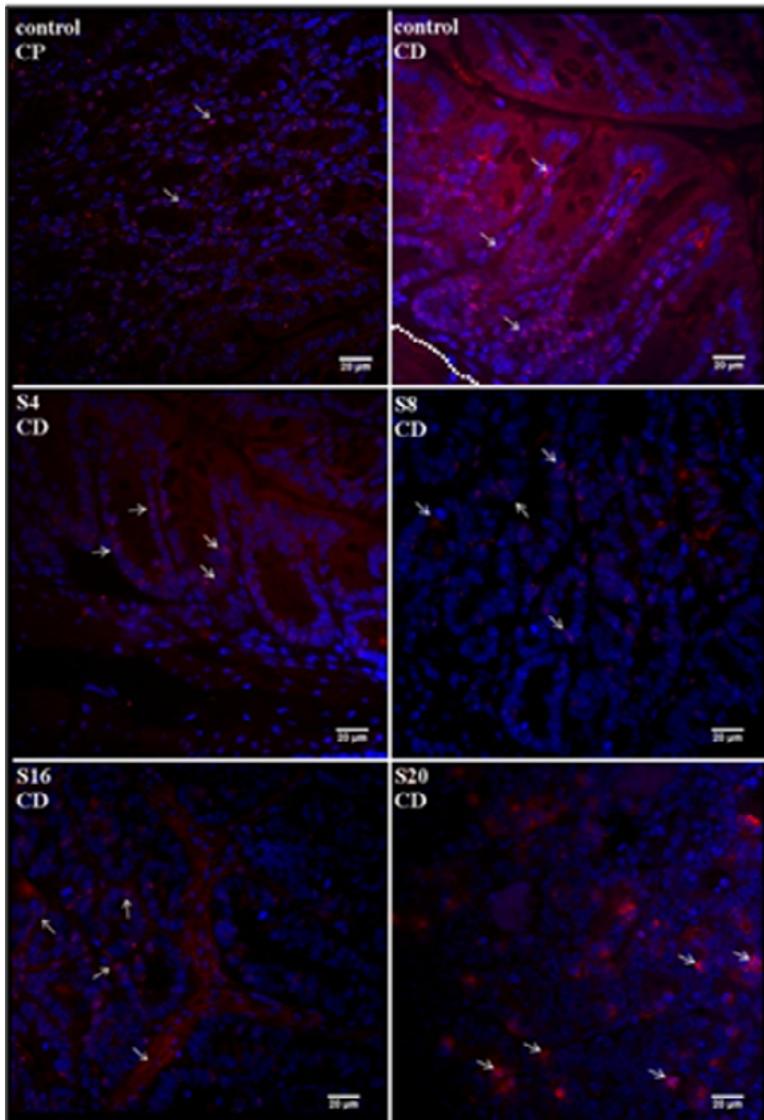


FIGURE 9

Cuantificación de los ARNm de las ETs en el CCR

En la Figura 10 y Figura 11 pueden observarse los niveles de expresión génica de los péptidos y receptores del sistema de endotelinas estudiados, donde se corroboró que tanto péptidos como receptores se expresan en colon proximal y en colon distal. Notablemente, la expresión génica de ET-2 en colon distal, tiene una expresión de un 18% comparada con el segmento proximal. Y pasa a ser no detectable por la técnica utilizada en los primeros estadios de la progresión del cáncer, lo cual puede visualizarse en la Figura 10a, en el muestreo de la cuarta semana post-inducción. Esta característica se mantiene durante la progresión del cáncer en colon distal, hecho que coincide con la aparición y desarrollo de tumores en ese segmento y que podría estar relacionado al silenciamiento del gen de END2. En el colon proximal en cambio, la desaparición de ET-2 es más lenta, observándose solo en algunos especímenes, hasta la veinteva semana posterior a la inducción, cuando deja de ser detectable en los cinco individuos analizados. Nuevamente, esto se condice con la expansión de tumores desde el colon distal hacia el proximal, hecho que es más notable en el último punto de muestreo, es decir en

la veinteva semana post-inducción. A diferencia de lo que ocurre con ET-2, ET-1 se expresa en colon proximal, un 18% de lo que se expresa en colon distal, como puede verse en la Figura 10b, donde las diferencias entre los dos segmentos son muy significativas. Estas diferencias entre la expresión génica de ET-1 en colon proximal y distal se van perdiendo a medida que progresa la patología, en la cuarta y octava semana aún los segmentos difieren significativamente, pero en la decimosexta y en la vigésima no existe diferencia entre ambos. A diferencia de lo que se esperaría de una molécula involucrada en varios aspectos del cáncer, en este trabajo no se observó un aumento en su expresión génica durante la progresión de la patología en los animales inducidos a desarrollar CCR, sino que además se verificó una disminución significativa en colon distal a la semana decimosexta.

El receptor ETA es el responsable de inducir la proliferación celular y la vasoconstricción y en muchas ocasiones se lo ha asociado al proceso canceroso. En este trabajo, los estudios de expresión génica del receptor ETA mostraron una tendencia incremental durante el desarrollo del CCR, aunque los niveles de variabilidad de los tumores y lesiones fueron muy altos y por lo tanto no se registraron aumentos o disminuciones estadísticamente significativos en el colon distal. En el colon proximal, a diferencia de lo observado en distal, los niveles de expresión del ARNm para ETA mostraron incrementos estadísticamente significativos en la octava semana respecto de los observados en los animales control, aunque esta tendencia no fue sostenida en el progreso de la patología (ver Figura 10c). Por otro lado, el receptor ETB, asociado a la relajación vascular mediante la producción de óxido nítrico y prostaciclina, y a la depuración de endotelinas, fue modificando su expresión génica a lo largo de la progresión de la patología solo en colon distal que, tal como describimos previamente, es el segmento más afectado por lesiones y tumores en este modelo. Este receptor se expresó un 79,5% menos en la cuarta semana y un 54,9% menos en la octava semana post-inducción del cáncer colorrectal, comparando con los valores respectivos en colon distal sano (Figura 10d).

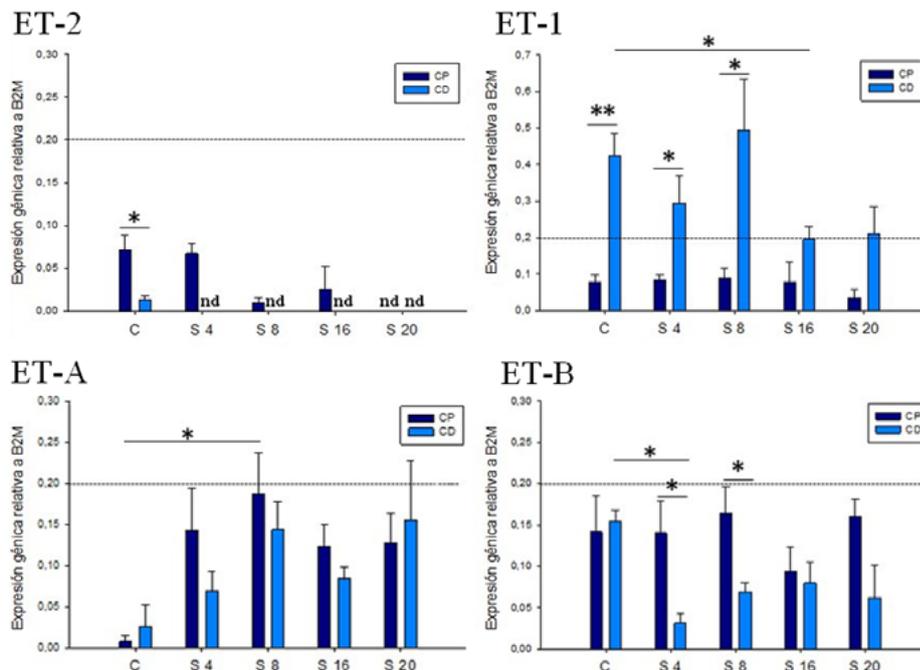


FIGURA 10. Expresión génica relativa al gen B2M de ET-2 (a), ET-1 (b), ET_A (c) y ET_B (d) en colon proximal y colon distal de ratón control (C) y tratado con AOM/DSS en la semana 4 (S4), 8 (S8), 16 (S16) y 20 (S20) posterior a la inyección de AOM. Los valores fueron expresados como media ± SEM. * p<0,05; ** p<0,01, n=5.

En la Figura 11 se analizó la expresión génica de las endotelinas en conjunto, a medida que transcurre la patología, diferenciando por segmentos del colon. En la Figura 11, en el colon proximal normal los péptidos no mostraron diferencias de expresión, mientras que en colon distal ET-1 se expresó un 90% más que ET-2, remarcando la dominancia en expresión génica de ET-1 en colon distal. Por otro lado, el receptor ETA se expresó solamente un 5,5% en colon proximal y un 17% en colon distal en relación al receptor ETB, manteniéndose la relación de dominancia de la expresión génica de ETB en colon sano. Otra particularidad que puede observarse en la Figura 11, es la desaparición de la señal de ET-2, la cual ocurre en la cuarta semana de la inducción del cáncer en colon distal y en la veinteava semana en colon proximal.

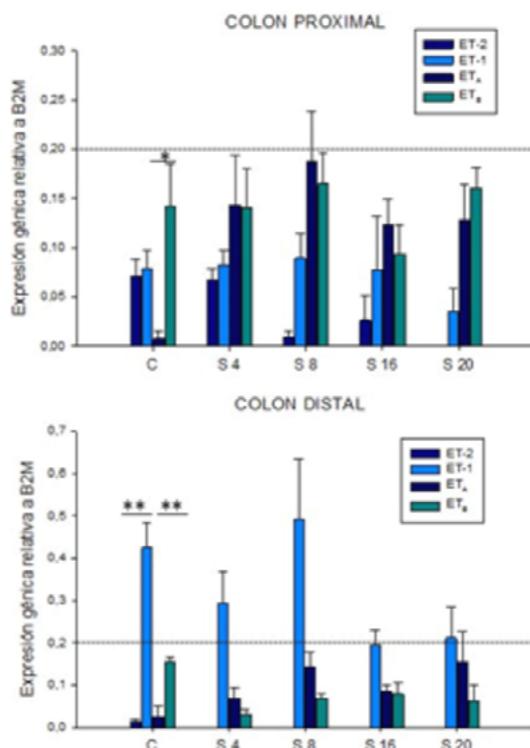


FIGURA 11. Expresión génica relativa al gen B2M de ET-2, ET-1, ET_A y ET_B en colon proximal y colon distal de ratón control (C) y tratado con AOM/DSS en la semana 4 (S4), 8 (S8), 16 (S16) y 20 (S20) posterior a la inyección de AOM. Los valores fueron expresados como media ± SEM. * p<0,05; ** p<0,01, n=5

Autofluorescencia como herramienta de diagnóstico del CCR

Los estudios de epifluorescencia realizados en ratones normales, permitieron determinar que la autofluorescencia de la superficie del colon refleja un patrón puntiforme que se extiende principalmente en el epitelio de recubrimiento y en menor grado, en la lámina propia (Figura 12 control AF). Cuando se observan y registran imágenes del colon mediante luz transmitida desde el compartimiento luminal, las criptas colónicas presentan una superficie con un patrón redondeado con una separación prácticamente constante entre sí. (Figura 12, control LT). Siguiendo la clasificación de Kudo, estas características se corresponden con las descritas como del tipo I. Siguiendo la misma estrategia de muestreo y registro, el colon de los ratones sometidos a cuatro semanas de inducción química, exhiben bajo luz transmitida, claras modificaciones en la regularidad del patrón de distribución de las criptas colónicas. Estas pre-

sentan signos de agrandamiento, visualizándose criptas elongadas y en algunos casos, ramificadas. De acuerdo a la clasificación de Kudo, se pueden verificar algunas zonas con patrones de distribución que pueden ser caracterizados como lesiones de tipo II y otras con patrones del tipo III L (Figura 12 S4 LT). Adicionalmente, las observaciones por epifluorescencia permiten observar una pérdida del patrón de fluorescencia puntiforme, observado en las muestras control, la que es reemplazada por zonas de fluorescencia difusa y regiones con un punteado de mayor calibre (Figura 12 S4 AF).

Siguiendo la progresión del cáncer, en la octava semana postinducción química, los análisis de luz transmitida, permitieron determinar que algunos especímenes mostraron patrones compatibles con los clasificados como de tipo III L de Kudo, mientras que otros pueden ser caracterizados como lesiones de tipo IV, exhibiendo la totalidad de sus criptas ramificadas (Figura 12 S8 LT). En este estadio experimental se verifica un incremento de la fluorescencia difusa, en detrimento del patrón punteado característico de los tejidos normales (Figura 12 S8 AF).

Finalmente, en los tejidos colónicos de los animales de las semanas decimosexta y veinteava postinducción, las muestras colectadas observadas por luz transmitida presentan, en algunos casos patrones tipo IV según la clasificación de Kudo, visualizándose en la superficie del colon, figuras de surcos sinuosos y ramificados (Figura 12 S16 LT), mientras que en otros casos se observó un patrón irregular con criptas carentes de luz (Figura 12 S20 LT). Los análisis de epifluorescencia permitieron determinar que en este estadio, se visualiza un patrón de granulado fluorescente atípico de fuerte intensidad, con desplazamiento hacia el centro de las criptas, combinado con regiones de fluorescencia más difusa (Figura 12 S16 y S20 AF).

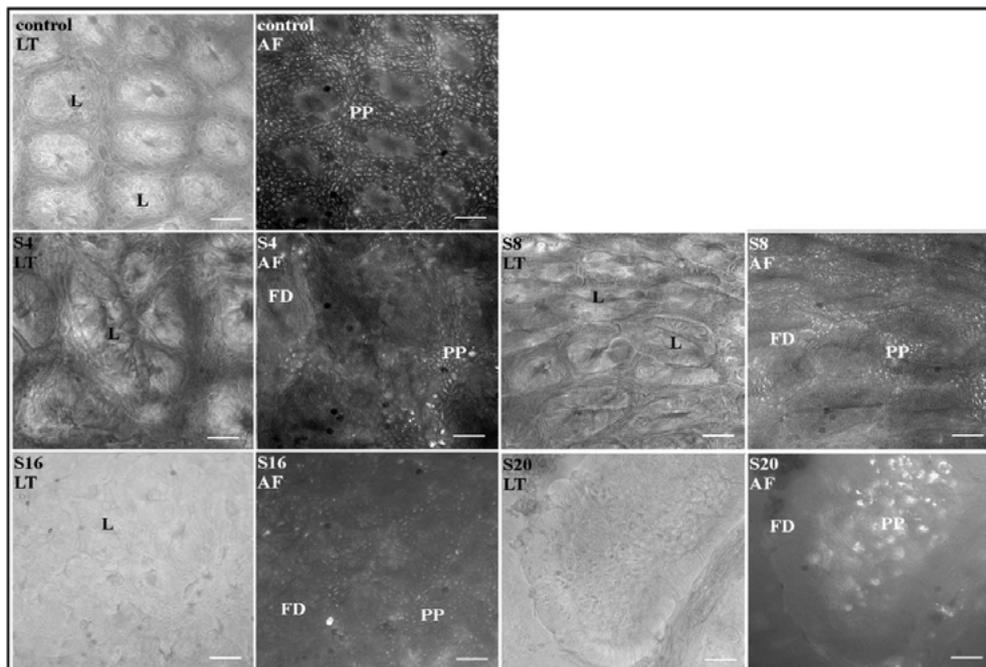


FIGURA 12. Imágenes obtenidas con luz transmitida (LT) e imágenes de autofluorescencia (AF) del tejido colónico fresco, obtenidas de la superficie luminal del colon distal de animales tratados con AOM/DSS a las semanas 4(S4), 8 (S8), 16 (S16) y 20 (S20) posterior a la inyección de AOM. L: luz de las criptas, PP: patrón punteado, AD: autofluorescencia difusa. Barras: 30µm

En el siguiente gráfico se observan los resultados de la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia en la mucosa del colon.

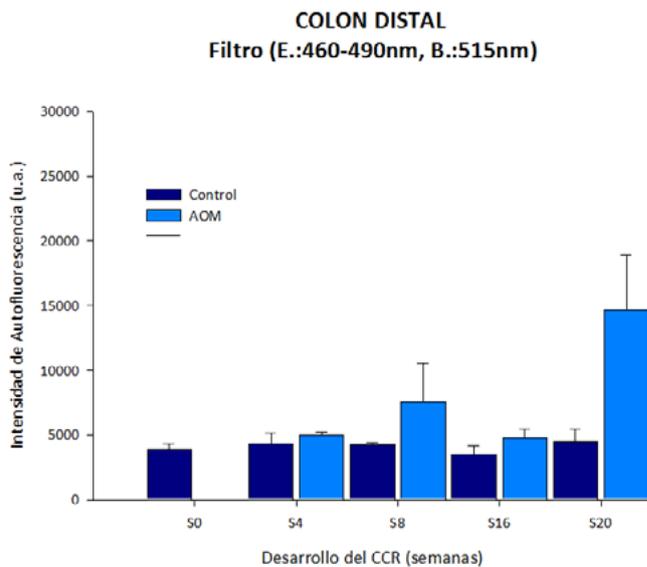


FIGURA 13. Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia en la mucosa del colon distal a las diferentes semanas del experimento

En estos estudios se detectó un aumento significativo en la intensidad de la autofluorescencia en la etapa temprana de la enfermedad, semana 4 a 8. Si bien, permanecen sin identificación las causas de los cambios de la autofluorescencia de la mucosa; se postula que se pueden deber a cambios en la composición, distribución u organización del tejido. Más específicamente a las características de los fluoróforos endógenos presentes (Gabrecht 2006). Los estimulados o que absorben energía a las longitudes de onda utilizadas en este estudio son las correspondientes a las flavinas (FAD, que interviene en el metabolismo energético celular) y las porfirinas (hemoglobina, cuya intensidad de fluorescencia depende del pH del medio) (Haringsma 2001). Si se asocia el aumento de la intensidad de autofluorescencia, con los posibles fluoróforos excitables, se puede atribuir al incremento de la actividad metabólica celular en los primeros estadios del CCR y asimismo a los incrementos verificados en la irrigación sanguínea en las zonas de desarrollo tumoral.

Distribución del colágeno como herramienta de diagnóstico de CCR

La microscopía de generación de segundo armónico (SHG) es una técnica particularmente útil para visualizar estructuras anisotrópicas. Uno de los componentes que exhiben estas características son las fibras de colágeno presentes en la matriz extracelular de los tejidos animales. La distribución de las fibras colágenas en el colon murino normal está principalmente localizada en la submucosa y en menor proporción en la mucosa (Figura 14, Control SHG). Desde una perspectiva cualitativa, la observación de la submucosa de los animales inducidos a desarrollar tumores permite determinar un incremento en la cantidad de las fibras de colágeno y paralelamente, su organización parece tornarse caótica conforme avanza la patología. En la Figura 14 se presenta, una combinación de las imágenes de SHG y emisión de fluorescencia por dos fotones (TPEF) donde pueden visualizarse tanto la capa mucosa como la submucosa, separadas por la muscular de la mucosa, tanto en animales sanos como en el desarrollo del CCR. Con el objetivo de obtener datos cuantitativos sobre las modificaciones del arreglo y la orientación de las fibras colágenas, se midió el grado de ordenamiento de las mismas en la submucosa y en cada estadio del desarrollo de la enfermedad.

Confirmando las apreciaciones cualitativas observadas en las imágenes, se verifica que el colágeno de los tejidos alterados sufre cambios progresivos en su grado de ordenamiento desde el inicio de la patología. Los cálculos de la FFT de las imágenes de SHG, ver Adur y col., 2014, arrojaron como resultado que se verifica existe un aumento muy significativo ($p < 0,01$) en la relación de aspecto de las fibras colágenas de los tejidos alterados, desde los estadios tempranos de la patología (S4) y los mismos se mantienen conforme evoluciona la patología tumoral (S8, 16 y 20) (ver Figura 15).

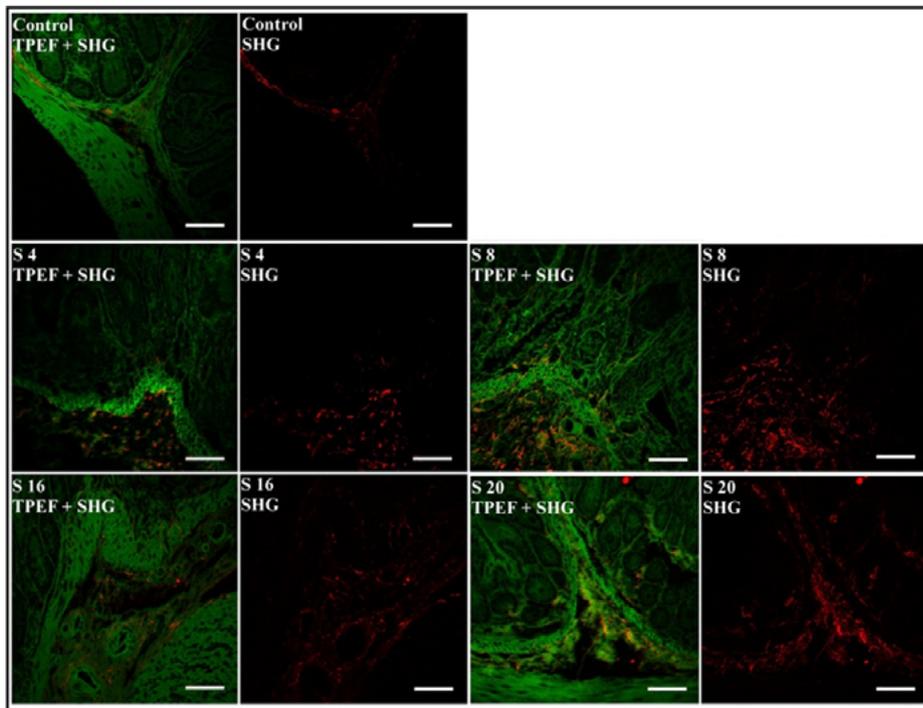


FIGURA 14. Imágenes de una combinación de TPEF+SHG, obtenidas a partir de tinciones de E&H de colon distal de animales tratados con AOM/DSS a las semanas 4(S4), 8 (S8), 16 (S16) y 20 (S20) posterior a la inyección de AOM

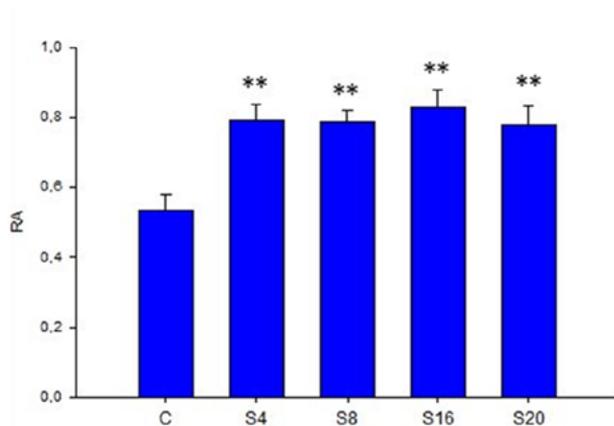


FIGURA 15. Relación de aspecto obtenida del ajuste elíptico de la FFT de las imágenes de SHG obtenidas del tejido fresco de ratones control y ratones tratados con AOM/DSS a las semanas 4ta, 8va, 16ta y 20ma de la inducción del cáncer colorectal. ** $p < 0,01$ (n=3)

Conclusiones

Como fue descripto previamente (Tanaka y col., 2003; Rosenberg y col., 2009), en este trabajo comprobamos también que las lesiones y tumores se desarrollan en el colon distal. En general, los tumores generados con AOM y DSS tienden a ser no metastásicos, y raramente se encuentra evidencia de invasión celular (Boivin y col., 2003). Se ha postulado que el cáncer de colon se desarrolla por un proceso de varios pasos en el que, a partir de criptas normales proliferan focos de criptas aberrantes (FCA), estas se replican formando microadenomas. Estos se amplifican originando adenomas macroscópicos, pólipos adenomatosos y finalmente, adenocarcinomas. Por lo tanto, existe una progresión morfológica y genética a través de la secuencia adenoma-carcinoma (Ward 1974). Tal desarrollo tumoral puede ser eficientemente reproducido en el modelo murino de AOM/DSS con una alta reproducibilidad. En este proyecto, se desarrollaron entre 3 y 5 tumores macroscópicos en el 100% de los animales en la veintava semana. Es frecuente que los tumores inducidos por AOM/DSS muestren un crecimiento adenomatoso, antes de desarrollar degeneración maligna. Histológicamente los tumores exhibieron características de adenomas tubulares o adenocarcinomas tubulares moderadamente / bien diferenciados, como se describió en los resultados, y como postulo Ward y col. El desarrollo del cáncer en este modelo refleja con alto nivel de fidelidad el patrón que se observa en los seres humanos.

Habiendo logrado eficientemente el desarrollo del modelo de inducción de cáncer de colon y obteniendo las lesiones y tumores, debidamente caracterizadas, se procedió con el estudio de las endotelinas. El principal cambio observado en la cuarta semana post-inducción del cáncer colorrectal fue la disminución de la expresión génica de ET-2 en colon distal, a tal punto de no ser detectable por la técnica utilizada en este estudio. Además, esta característica se mantuvo durante la progresión del cáncer, mientras que en colon proximal recién pasó a ser no detectable cuando la patología estaba muy avanzada. La disminución de la expresión génica de ET-2 fue también visualizada por inmunofluorescencia, en colon distal. Esta evidencia se condice con los resultados obtenidos por Wang y col., donde se detectó la disminución de la expresión génica de ET-2 en células de cáncer de colon varias semanas antes de la aparición de los tumores (Wang y col., 2013), se demostró además el silenciamiento de su promotor y se puso en evidencia que expresión forzada de dicho péptido condujo a la atenuación de la migración e invasión. Wang y col, trabajaron sobre el órgano completo, mientras que en este trabajo se distinguió el colon en colon proximal y distal, además, dado que en este modelo los tumores se generan en colon distal, la ET-2 estaría disminuyendo específicamente en la zona afectada por la patología. En conjunto, esta evidencia indicaría que ET-2 tendría un rol supresor de tumores en colon, y además, su disminución podría ser un biomarcador temprano de la transformación maligna (Bianchi et al., 2013). Una diferencia muy marcada entre ET-1 y ET-2 es que en la bibliografía se ha reportado la sobreexpresión de ET-1 en varios tipos de cánceres metastásicos y en cáncer de colon (Asham et al., 2001). En este último artículo se encontraron niveles de ET-1 en plasma significativamente incrementados tanto en pacientes con tumores primarios como con metástasis (Asham et al., 2001). En este trabajo en cambio no se ha encontrado una sobreexpresión de ET-1 en ningunos de los puntos experimentales estudiados, a lo largo de la progresión del cáncer en colon proximal o en colon distal. Sin embargo, teniendo en cuenta que los tumores obtenidos por este modelo presentaron baja capacidad de invasión, estos resultados indicarían que la sobreexpresión de ET-1 podría estar relacionada principalmente con la invasión a distancia y metástasis.

En este estudio se encontró que mientras que el receptor ETA se expresa en el citosol de las células de la túnica mucosa, la localización celular de ETB fue principalmente nuclear, tanto en tejido normal como patológico. Esta inmunolocalización había sido reportada previamente en el tracto gastrointestinal de animales normales por Takizawa y colaboradores (Takizawa et al., 2004). Otros estudios de inmunofluorescencia mostraron también la presencia de receptores de ETA y ETB en la

membrana plasmática, citosol, y las membranas de envoltura nuclear, así como en el nucleoplasma en células cardíacas y vasculares (Bkaily y col., 2011; Jacques y col., 2000). Bkaily y colaboradores revisaron evidencia donde se asevera que los receptores de la membrana nuclear pueden modular el funcionamiento de los transportadores iónicos a nivel nuclear, y así contribuir a la regulación de la homeostasis iónica nuclear. En esta revisión también se afirma que la regulación de la homeostasis iónica citosólica y nuclear es dependiente del “diálogo” entre los receptores y transportadores iónicos de la membrana plasmática y aquellos presentes en la membrana nuclear. Este “diálogo” parece aportar las bases para el acoplamiento de las funciones de excitación-contracción, excitación-secreción y excitación-expresión génica (Bkaily y col., 2012). En células de cultivo hVSMCs y hEECs tanto ETA como ETB mediaron los efectos de ET-1 intracelular y extracelular sobre el Ca²⁺ citosólico y nuclear (Jacques y col., 2005; Bkaily y col., 2011), aunque no fueron estudiados los efectos de los otros ligandos. En el presente trabajo también fue reportada la localización de ET-1 y ET-2 en el núcleo de algunas células de la mucosa colónica, por lo que alguno de estos dos ligandos, o los dos, podrían estar actuando de forma autocrina o intrácrina a nivel de la membrana nuclear.

Mientras la mayoría de los crecimientos anormales son detectados por la endoscopia de luz blanca, la técnica de cribado más aceptada para cáncer de colon, un número significativo de lesiones no son detectadas por la misma, lo que potencialmente resulta en el avance de la enfermedad. Estas lesiones son a menudo planas y de color poco visible. La espectroscopia de autofluorescencia (AF) es una de las técnicas de diagnóstico para tejidos orales, bronquiales y colorrectales debido a sus características de alta sensibilidad y baja invasividad. Los fluoróforos endógenos específicos que contribuyen a la autofluorescencia incluyen: residuos de aminoácidos aromáticos que se encuentran en la mayoría de las proteínas ($\lambda_{ex} = 200$ a 340 nm, $\lambda_{em} = 360$ - 370 , 455 nm); nucleótidos de piridina reducidos (NADH, NADPH), que son cofactores en el metabolismo celular y se encuentran principalmente en las mitocondrias, pero también están presentes en el citoplasma ($\lambda_{ex} = 360$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm) (Aubin 1979); flavinas y nucleótidos de flavina (riboflavina, mononucleótido y dinucleótido de flavina), que están unidas principalmente a las enzimas como coenzimas de flavoproteínas y se concentra en las mitocondrias ($\lambda_{ex} = 360$ nm, 445 - 470 nm, $\lambda_{em} = 440$ nm, 520 nm) (Benson y col., 1979). Las porfirinas endógenas y la lipofuscina relacionada con la edad también han demostrado ser fuentes de autofluorescencia celular (Loh y col., 1993; Perriott y col., 2001). Estudios previos indican que los cambios metabólicos y estructurales durante la transformación neoplásica podrían reflejarse en cambios en el perfil del espectro de AF (por ejemplo, forma e intensidad), permitiendo una identificación fehaciente de lesiones que con endoscopia de luz blanca no se podrían detectar. En el presente proyecto, se trabajó con muestras frescas y se fotografió la superficie del epitelio colónico, encontrándose un incremento en la intensidad de la autofluorescencia con el avance de la enfermedad; así como un punteado característico en la mucosa colónica (Ruff y col., 2015).

Otro de los estudios realizados en el presente proyecto, permitió analizar el colágeno por medio de la técnica de microscopia de generación de segundo armónico (SHG). Una ventaja de la tecnología SHG en comparación con otras técnicas de visualización, como las imágenes de campo brillante de H&E, es la selectividad de la misma, ya que solo permite ver el patrón de la fibrilla de colágeno permaneciendo ciega al resto de las estructuras en el tejido (Adur y col., 2012, 2013, 2014). Cabe señalar que estas características (presencia y ángulo de las fibras de colágeno) no son fácilmente visualizadas en las secciones teñidas con H&E. Esto permite un procesamiento digital automático de la imagen de una única señal, la del colágeno. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con estudios previos (Provenzaco y col., 2008a, 2008b). Jain y colaboradores demostraron que un aumento de la concentración de colágeno (es decir, desmoplasia) se asoció al tumor de células de melanoma implantado (Jain y col., 2012). Por otra parte, en un análisis completo de tracto gastrointestinal humano, Nathanson y col. encontraron una pequeña cantidad de colágeno en los tejidos benignos (Rogart y

col., 2008). En un trabajo previo se obtuvieron imágenes por SHG y TPEF de las capas mucosa y submucosa en el recto humano normal (Liu y col., 2010). Junto con otros componentes y estructuras, se informó el contenido y la distribución de las fibras de colágeno (Liu y col., 2010), también se destacaron los beneficios de esta técnica como un nuevo y prometedor método para la detección del cáncer rectal temprano. En otro estudio se ha propuesto distinguir entre epitelio normal, displasia de alto grado y cáncer, usando imágenes de SHG de colon humano (Birk y col., 2014), sin embargo no fueron evaluadas las etapas tempranas de la patología. El presente estudio demuestra que la microscopía SHG permite detectar cambios tempranos de la submucosa del colon en un modelo animal de cáncer colorrectal. Mientras que las imágenes TPEF contribuyeron a la comprensión de las microestructuras del tejido, la microscopía SHG permitió la identificación de dos características de colágeno (cantidad y orientación de las fibras), que mostraron diferencias significativas en las diferentes etapas del cáncer de colon. Con la ayuda de estos datos, fue posible obtener información cuantitativa (cantidad y puntuación RA) en diferentes etapas del cáncer. De acuerdo con nuestros resultados previos, los informes anteriores en colon humano y otros tejidos sugieren que las células epiteliales preferentemente invaden tejidos en donde las fibras de colágeno se encuentran perpendicularmente alineadas, en lugar de los dispuestos al azar (Provenzano y col., 2008a). Por lo tanto, la microscopía SHG resulta ser una poderosa herramienta cuantitativa que podría detectar cambios tempranos de la submucosa y su progresión a través de la expansión del cáncer. Los presentes resultados sugieren que tanto la concentración de colágeno como su orientación son factores importantes en la progresión tumoral, fundamentalmente en los estadios tempranos, y podrían utilizarse como biomarcadores (Bianchi y col., 2014).

Resumiendo, el presente proyecto nos ha permitido reproducir la patología del cancer colorrectal en un modelo murino, en el cual estudiamos el sistema endotelinas y fundamentalmente la ET-2 de la cual poco se conoce. Los resultados obtenidos hasta el momento complementados a los diferentes estudios de microscopia de autofluorescencia y de segundo armónico, nos han permitido identificar posibles alternativas (que seguiremos investigando) para diagnosticar la patología en estadios más tempranos.

Referencias

- ADUR J, Pelegati VB, de Thomaz AA, Baratti MO, Almeida DB, Andrade LA, Bottcher-Luiz F, Carvalho HF, Cesar CL (2012). Optical biomarkers of serous and mucinous human ovarian tumor assessed with nonlinear optics microscopies. *PLoS One*. 7(10):e47007.
- ADUR J, DSouza-Li L, Pedroni MV, Steiner CE, Pelegati VB, de Thomaz AA, Carvalho HF, Cesar CL (2013). The severity of Osteogenesis imperfecta and type I collagen pattern in human skin as determined by nonlinear microscopy: proof of principle of a diagnostic method. *PLoS One*. 15;8(7):e69186.
- ADUR J, Carvalho HF, Cesar CL, Casco VH (2014). Nonlinear optical microscopy signal processing strategies in cancer. *Cancer Inform*. 13:67-76.
- ADUR J, Pelegati VB, de Thomaz AA, Baratti MO, Andrade L.A.L.A, Carvalho HF, Bottcher-Luiz F, and Cesar CL (2014). Second harmonic generation microscopy as a powerful diagnostic imaging modality for human ovarian cancer. *J. Biophotonics*. 7(1-2): 37-48.
- ASHAM E et al. (2001) Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. *Br J Cancer* 85:1759-1763.
- AUBIN JE (1979). Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J Histochem Cytochem* 27:36-43.
- BENSON RC, Meyer RA, Zaruba ME, et al (1979). Cellular autofluorescence -is it due to flavins? *J Histochem Cytochem* 27:44-48.

- BIANCHI M, Adur J, Takizawa S, Saida K, and Casco VH (2012). Endothelin system in intestinal villi: A possible role of endothelin-2/vasoactive intestinal contractor in the maintenance of intestinal architecture. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417: 1113-1118.
- BIANCHI M, Adur J, Izaguirre MF, Viale S, Cesar CL, and Casco VH (2013). Endothelin-2 Differential Expression in Normal and Early-Stages of Colon Cancer Development. *Journal of Cancer Therapy* 4: 26-33.
- 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. *Bio-Medical Materials and Engineering* 6:3419-3426.
- BIRK JW, Tadros M, Moezardalan K, Nadyarnykh O, Forouhar F, Anderson J, Campagnola P (2014). Second harmonic generation imaging distinguishes both high-grade dysplasia and cancer from normal colonic mucosa. *Dig Dis Sci.* 59:1529-1534.
- BKAILY G, Avedanian L, Al-Khoury J, Provost C, Nader M, D'Orléans-Juste P, Jacques D (2011) Nuclear membrane receptors for ET-1 in cardiovascular function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 300:R251-R263.
- BKAILY G, Avedanian L, Al-Khoury J, Ahmarani L, Perreault C, Jacques D (2012). Receptors and ionic transporters in nuclear membranes: new targets for therapeutical pharmacological interventions. *Can J Physiol Pharmacol.* 8:953-965.
- BOIVIN GP (2003). Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology* 124:762-777.
- DE ROBERTIS M (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog* 10: 9.
- GABRECHT T (2006). Clinical fluorescence spectroscopy and imaging for the detection of early carcinoma by autofluorescence bronchoscopy and the study of the protoporphyrin IX pharmacokinetics in the endometrium. [Thèse EPFL, no 3537. Dir. Georges Wagnières]. Lausanne: École Polytechnique Fédérale de Lausanne.
- GRANT K, Loizidou M, and Taylor I (2003). Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer. *Br J Cancer* 88: 163-166.
- HARINGSMA J (2001). Autofluorescence endoscopy: feasibility of detection of GI neoplasms unapparent to white light endoscopy with an evolving technology. *Gastrointest Endosc* 53: 642-650.
- JACQUES D, Sader S, Choufani S, D'Orléans-Juste P, Charest D (2000). Endothelin-1 regulates cytosolic and nuclear Ca²⁺ in human endocardial endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 36:S397-S400.
- JACQUES D, Descorbeth M, Abdel-Samad D, Provost C, Perreault C, Jules F (2005). The distribution and density of ET-1 and its receptors are different in human right and left ventricular endocardial endothelial cells. *Peptides.* 26:1427-1435.
- JAIN M, Robinson BD, Scherr DS, Sterling J, Lee MM, Wysock J, Rubin MA, Maxfield FR, Zipfel WR, Webb WW, Mukherjee S (2012). Multiphoton microscopy in the evaluation of human bladder biopsies. *Arch Pathol Lab Med.* 136:517-526.
- JEMAL A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, and Forman D (2011). Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61: 69-90.
- LAUBER K, Bohn E, Kröber SM, Xiao Y, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113: 717-730.
- LIU N, Chen G, Chen J, Yan J, Zhuo S, Zheng L, Jiang X (2010). Multiphoton microscopic imaging of normal human rectum tissue. *Scanning.* 32:347-350.
- LOH CS, Vernon D, MacRobert AJ, et al (1993). Endogenous porphyrin distribution induced by 5-aminolaevulinic acid in the tissue layers of the gastrointestinal tract. *J Photochem Photobiol* 20:47-54.

- PERRIOTT LM, Kono T, Whitesell RR, et al (2001). Glucose uptake and metabolism by cultured human skeletal muscle cells: rate-limiting steps. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E72–E80.
- PROVENZANO PP, Eliceiri KW, Yan L, Ada-Nguema A, Conklin MW, Inman DR, Keely PJ (2008a). Nonlinear optical imaging of cellular processes in breast cancer. *Microsc Microanal.* 14:532-548.
- PROVENZANO PP, Inman DR, Eliceiri KW, Trier SM, Keely PJ (2008b). Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophys J.* 95:5374-5384.
- ROGART JN, Nagata J, Loeser CS, Roorda RD, Aslanian H, Robert ME, Zipfel WR, Nathanson MH (2008). Multiphoton imaging can be used for microscopic examination of intact human gastrointestinal mucosa *ex vivo*. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 6:95-101.
- ROSENBERG DW, Giardina C, and Tanaka T (2009). Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 30: 183-196.
- RUFF SY, Adur J, Bianchi M, and Casco VH (2015) . Autofluorescence of the intestinal mucosa in a mouse colorectal cancer model. *IFMBE Proceedings* 49: 437-439.
- TAKIZAWA S, Uchide T, Adur J, Kozakai T, Kotake-Nara E, Quan J, Saida K (2005). Differential expression of endothelin-2 along the mouse intestinal tract. *Journal of Molecular Endocrinology* 35:201-209.
- TANAKA T (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 94: 965-973.
- WANG R et al. (2013) Epigenetic inactivation of endothelin-2 and endothelin-3 in colon cancer. *Int J Cancer* 132: 1004-1012.
- WARD JM (1974). Morphogenesis of chemically induced neoplasms of the colon and small intestine in rats. *Lab Invest* 30:505-513.