

A white mouse is shown in profile, looking towards the right. It is standing on a dark, reflective surface that shows its reflection. The background is a blurred image of a person's face, with a focus on the eye area.

Prevención de colitis experimental crónica inducida por dextrán sulfato sódico (DSS) en ratones tratados con FR-91

Iván Carrera*, Valter R.M. Lombardi**, Ignacio Etcheverría**, Enrique Martínez[^], Rafael Chacón[^], Ramón Cacabelos***

* Departamento de Neurociencias, EuroEspes Biotecnología, A Coruña, España

** Departamento de Biotecnología de la Salud, EuroEspes Biotecnología, A Coruña, España

[^] GEAMED España, Collado Villalba, Madrid, España

*** Instituto para Enfermedades del Sistema Nervioso Central y Medicina Genómica, Centro de Investigación Biomédica EuroEspes, Bergondo, A Coruña, España

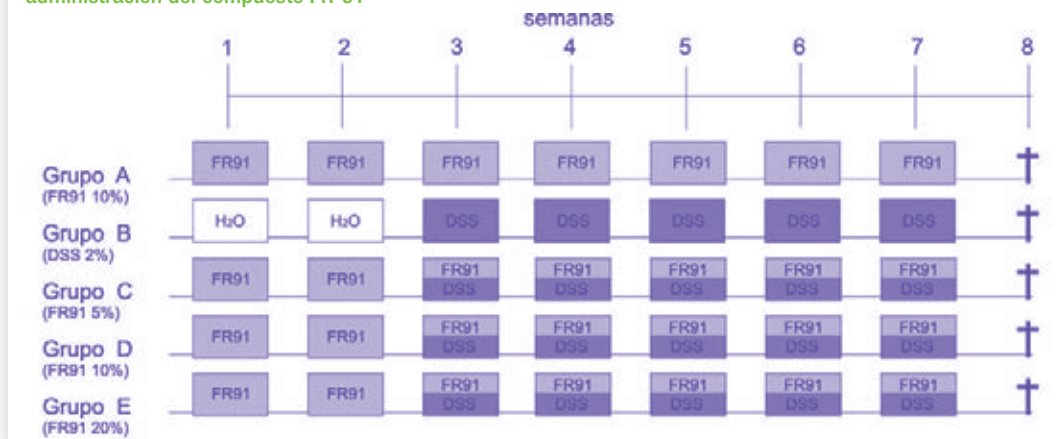
Abstract

U

no de los principales tratamientos actualmente utilizados en humanos para combatir el cáncer es la quimioterapia. Un gran número de compuestos con actividad antitumoral están presentes en la naturaleza, y muchos de sus derivados son producidos por microorganismos. Sin embargo, debido fundamentalmente a la toxicidad de los fármacos y a la resistencia a muchos agentes quimioterápicos que se observa durante el tratamiento, la búsqueda de nuevos medicamentos aún representa uno de los objetivos principales

de la terapia antitumoral. En modelos animales, la administración oral de dextrán sulfato sódico (DSS) durante un período relativamente corto determina colitis, con características similares a los daños clínicos e histopatológicos que se observan en la colitis ulcerosa (UC). Los factores patogénéticos responsables de la colitis inducida por el DSS, y del sucesivo desarrollo del cáncer de colon, aún no han sido identificados. Hemos investigado los efectos del compuesto FR-91, un lisado estandarizado de células microbianas »

Fig. 1. Protocolo experimental para la inducción de colitis/cáncer de colon mediante DSS en ratones y para la administración del compuesto FR-91



que pertenecen al género *Bacillus*, que en anteriores estudios ha demostrado una significativa actividad inmunomoduladora, en la prevención de la carcinogénesis colorrectal pre-maligna. La colitis ha sido inducida en ratones durante un período de cinco semanas mediante administración oral de una solución de DSS al 2%. Los cambios morfológicos en la mucosa del colon fueron evaluados mediante tinción con hematoxilina-eosina (H&E) y mediante métodos inmunohistoquímicos. Se ha demostrado, en células crípticas y adenocarcinomas del epitelio displásico intestinal, la expresión de catenina- β , MLH-1, APC y p53, junto con un aumento en la expresión de IFN- γ . En este modelo, la mejor dosis-respuesta observada ha sido la concentración del 20% del

hoy no se ha identificado un agente etiológico individual, y por esta razón la patogénesis de la IBD es muy compleja e involucra al ambiente externo, las bases genéticas, la microflora intestinal, y el sistema inmunológico². Aunque nuevos y eficaces tratamientos están disponibles, la mayoría de ellos son fármacos biológicos o inmunosupresores que a menudo se asocian con importantes efectos secundarios, en particular infecciones, y un aumento en el riesgo de manifestaciones tumorales³, y en los costes médicos que requieren de continuos ajustes en los diferentes tratamientos. Consecuencia directa de esta situación es la necesidad de establecer lo antes posible pautas de predicción y de respuesta al tratamiento. Se ha realizado un gran número de intentos con el objetivo de identificar las características clínicas, los tratamientos combinados y los biomarcadores genéticos y serológicos que permitan la predicción de la respuesta frente a diferentes agentes biológicos. Pocos estudios se han publicado sobre cómo biomarcadores de la mucosa/tejido intestinal son capaces de predecir el comportamiento clínico de la enfermedad o su respuesta al tratamiento farmacológico⁴.

En los últimos años, se han desarrollado diferentes modelos animales de inflamación intestinal. Debido a su capacidad de interferir con la función de la barrera intestinal y estimular un proceso de inflamación local y sistémico, el dextrán sulfato sódico (DSS), un polisacárido parecido a la heparina⁵, se utiliza a menudo en un modelo de colitis en ratones que imita las manifestaciones clínicas e histológicas de la IBD con características de la UC. Okayasu y sus colaboradores⁶ han demostrado que la administración oral de 5% de DSS en el agua a ratones BALB/c es capaz de inducir colitis crónica después de diferentes ciclos con DSS. A este estudio le siguió otro de Cooper y colaboradores⁷ que utilizaron otro esquema experimental para la inducción de colitis crónica: (a) 7 días de administración de DSS seguidos de 7 días de agua (durante 1, 2 y



El proceso de carcinogénesis ocurre en múltiples etapas en las que pueden observarse tres estadios: iniciación, promoción y progresión

FR-91, en la que no se han observado alteraciones histológicas o sólo modestas lesiones inducidas por el DSS. Estos resultados sugieren que el FR-91 posee unas importantes propiedades antiinflamatorias en el modelo de inducción con DSS, y que puede actuar como agente quimio-preventivo frente a procesos de carcinogénesis de cáncer de colon.

Introducción

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) comprende un grupo de condiciones crónicas, que incluye la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerosa (UC), que afectan al colon y al intestino delgado. Las dos enfermedades están caracterizadas por dolor agudo, vómito y diarrea a los que siguen períodos de remisión¹. A día de

Fig. 2. Secciones histológicas de tres diferentes porciones del colon de los ratones del estudio experimental para demostrar la presencia de lesiones evidenciadas mediante tinción con H&E. Las figuras A-C corresponden a secciones transversales de tres diferentes niveles colorrectales (proximal, medial y distal) de los ratones del grupo A tratados con FR-91 (10%). Puede notarse la ausencia de lesiones y la presencia de estructuras similares a las observadas en ratones normales. Las figuras D-F son secciones transversales pertenecientes a tres diferentes niveles colorrectales de los ratones del grupo B tratados con DSS (2%) durante cinco semanas. En cada sección estudiada, es posible observar múltiples lesiones histopatológicas, siendo particularmente claro un grado severo de displasia (puntas de flecha en las figuras D y E) presente en el colon de los ratones de este grupo, junto a la presencia de criptas aberrantes (flecha en la figura D), pólipos adenomatosos en la figura F y ulceraciones incipientes en la figura F. Las figuras G-I son secciones transversales pertenecientes a tres diferentes niveles colorrectales de los ratones del grupo C tratados con DSS (2%) y FR-91 (5%) durante cinco semanas. A pesar de que las secciones del colon a los tres niveles presentan un bajo nivel de displasia y algunas ulceraciones puntuales de la mucosa, la estructura histológica parece en general funcional. Las figuras J-L son secciones transversales pertenecientes a tres diferentes niveles colorrectales de los ratones del grupo D tratados con DSS (2%) y FR-91 (10%) durante cinco semanas. Este grupo muestra una mejor organización histológica del colon con respecto a la observada en el grupo C, a pesar de que pueda observarse la presencia de algunas criptas displásicas principalmente a nivel de las secciones distales. Las figuras M-O son secciones transversales pertenecientes a tres diferentes niveles colorrectales de los ratones del grupo E tratados con DSS (2%) y FR-91 (20%) durante cinco semanas. Estas secciones muestran una organización epitelial normal, con células de las criptas bien diferenciadas y ausencia de lesiones con características atípicas. Barra de escala: 100 μ m

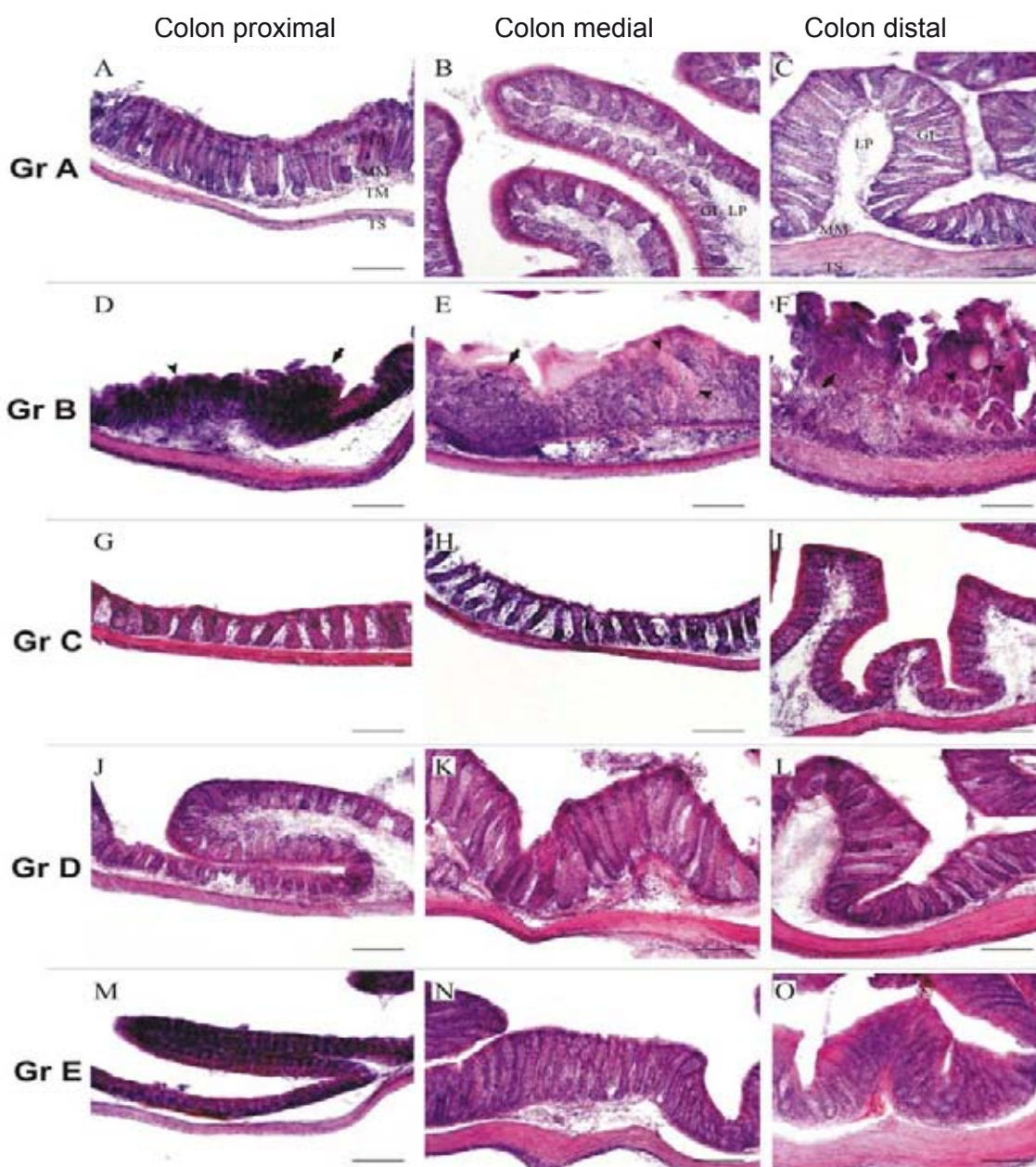
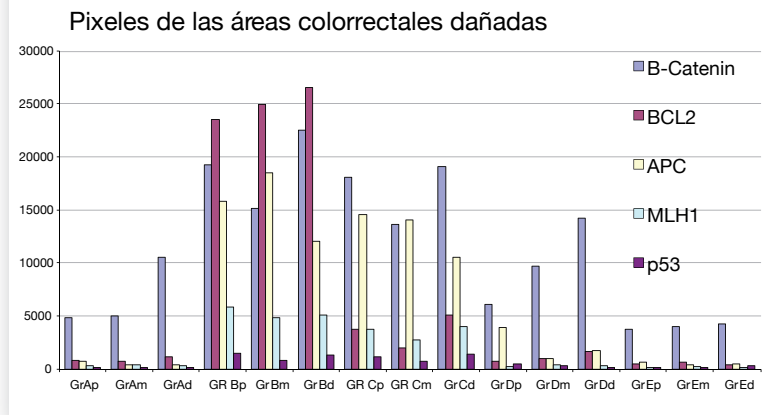


Fig. 3. Análisis de imágenes de las áreas colorrectales dañadas en las tres porciones del colon en cada grupo experimental. La cuantificación en píxeles del área inmunoreactiva afectada se ha realizado mediante un programa informático. En el grupo 5 se han observado diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a los otros grupos tratados (3 y 4)



3 ciclos); (b) 7 días de administración oral de DSS seguidos de 14 días y 21 días de agua. Los resultados de este estudio demostraron que la colitis crónica inducida después de la administración de DSS durante 7 días podía representar un modelo muy útil para el estudio de los efectos farmacológicos en enfermedades inflamatorias humanas y de los mecanismos moleculares de la inflamación, aportando también numerosas informaciones descriptivas de las lesiones histológicas, y demostrando que los principales cambios histológicos se observaban como pérdida en la cripta focal, con sucesivos signos de inflamación aguda y crónica.



La utilización de modelos experimentales animales representa una herramienta esencial para el desarrollo de nuevas terapias

En el presente estudio se ha investigado el efecto del extracto FR-91 en la reducción de la colitis crónica experimental inducida mediante DSS en ratones de la cepa Swiss. También se ha investigado la posibilidad de que en la fase crónica se pudiera observar una regulación en la expresión de genes apoptóticos y una desregulación del balance T-colaboradores 1/T-colaboradores 2 (Th_1/Th_2) y cómo esta situación podría facilitar una regeneración de la mucosa intestinal.

Materiales y Métodos

Animales

26 ratones hembra de la cepa Swiss, libres de enfermedad (7 semanas de edad, suministradas por el animalario de la Universidad de Santiago de Compostela, España) fueron mantenidas (2 o 3 por jaula) en jaulas de plástico con lecho

de viruta bajo las condiciones estándar de laboratorio (dieta esterilizable, $35\% \pm 10\%$ de humedad, $20-24^\circ\text{C}$ de temperatura, ventilación de 15 a 20 renovaciones de aire por hora, y ciclos de 12 horas de luz/oscuridad). Todos los ratones fueron mantenidos en cuarentena 3 semanas después de su llegada y sucesivamente distribuidos de forma aleatoria con respecto a su peso en grupos experimental y grupos control. A todos los ratones se les permitió libre acceso al pellet comercial A04 (dieta de mantenimiento, SAFE, Francia) y a las botellas de agua o agua más tratamiento. Todos los procedimientos utilizados han seguido las normas establecidas por la Directiva del 24 de Noviembre de 1986 de la Unión Europea (86/609/EEC), por el Decreto Real Español 1201/2005 en materia de experimentación animal, y la ley 32/2007 de 7 de noviembre, y fueron aprobados por el Comité Ético del Centro de Investigación de EuroEspes Biotecnología.

Diseño del estudio

El diseño del presente estudio se centró en primer lugar en la inducción de la displasia asociada a la colitis y/o en características del cáncer mediante la administración oral de DSS a los ratones y, sucesivamente, en su tratamiento mediante diferentes concentraciones orales del compuesto FR-91 (un lisado estandarizado de células bacterianas pertenecientes al género *Bacillus*) (Fig. 1). A la edad de 7 semanas, los animales fueron separados en dos grupos control (A y B, $n=4$ en cada grupo) y tres grupos experimentales (C-E, $n=6$ en cada grupo). En las primeras dos semanas, se administró agua con las diferentes concentraciones de FR-91 (5% en el grupo C, 10% en los grupos A y D, 20% en el grupo E) por vía oral a todos los animales de los grupos A, C-E. En la tercera semana, agua con 20 g/L (2%) de DSS (DSS; masa molecular 5000; D4911, Sigma-Aldrich; MO, USA) fue administrada por vía oral a los animales de los grupos B y E. Para las sucesivas comparaciones entre grupos, los grupos control A y B recibieron DSS o tratamiento sólo con FR-91, respectivamente, como controles no tratados. Todos los animales fueron sacrificados al final de la experimentación (octava semana), a la edad de 15 semanas.

Inducción de la colitis

La colitis experimental fue inducida en los ratones de los grupos B, C, D, y E mediante repetida administración de DSS al 2% (peso/volumen; 20 g/L) en el agua de bebida *ad libitum* durante cinco semanas. Esta dosis es suficiente, como se ha demostrado en estudios anteriores², para inducir una moderada hasta severa colitis, sin ocasionar mortalidad en los ratones tratados. Ninguno de los ratones tratados murió antes del final del estudio experimental (día 50).

Preparación de los tejidos

Los ratones fueron anestesiados con éter, perfundidos con solución salina y fijados con una solución al 4% de paraformaldehído en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.4). La totalidad de la región colorrectal (desde la unión ileocecal hasta el canal anal) fue retirada, medida, examinada macroscópicamente, lavada con solución salina, e inmediatamente fijada utilizando la misma solución de paraformaldehído durante un tiempo de 48 horas. La región colorrectal fue dividida en tres segmentos de la misma longitud (proximal, mediano y distal), determinada bajo un estereomicroscopio de disección (Leica, M125). Los segmentos colorrectales fueron protegidos durante el proceso de congelación mediante inmersión en una solución al 30% de sucrosa en tampón fosfato 0.1 M, incrustados en el compuesto OCT (Tissue Tek, Torrance, CA), y congelados en isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Series paralelas de secciones transversales de un espesor de 14-16 μm , que se obtuvieron utilizando un criostato (Starlet 2212, Bright, UK), fueron montadas en portas Superfrost Plus (Menzel Gläser®).

Tinción histológica e inmunohistoquímica

El examen rutinario histológico se realizó mediante tinción de las secciones con hematoxilina-eosina (H&E), en las que diferentes alteraciones morfológicas que se observan durante el desarrollo del cáncer colorrectal (como por ejemplo cripta absceso, displasia de la mucosa, adenoma y adenocarcinoma), fueron identificadas y diagnosticadas de acuerdo con estudios anteriores (Tanaka y colaboradores)⁸. Se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas para detectar la expresión de marcadores histopatológicos como el APC (se utiliza para detectar los niveles endógenos de proteínas supresoras tumorales), catenina- β (asociada con complejos APC), la p53 (asociada con mecanismos de apoptosis relacionados con el ciclo celular), BCL-2 (regulador de la apoptosis) y MLH1 (parte del complejo proteico de reparación de mal apareamiento del ADN). Para eliminar la peroxidasa endógena, las secciones primero fueron tratadas con H_2O_2 , lavadas dos

veces en tampón fosfato a pH 7.4 (10 minutos/lavado), y, para bloquear las uniones inespecíficas, fueron sucesivamente tratadas durante una hora con una solución de tampón fosfato 0.1 M con 0.2% de Tween 20 y 15% de suero normal de cabra (Dako, Glostrup, Dinamarca). Todos los anticuerpos policlonales primarios de conejo como anti-catenina- β , anti-p53, anti-BCL-2, anti-MLH1 y anti-APC fueron purificados mediante cromatografía de afinidad, utilizando inmunógenos específicos de ratón (Bioworld Technology, MN, USA;

“

FR-91 posee unas importantes propiedades antiinflamatorias en el modelo de inducción con Dextrán sulfato sódico en ratones

Catálogo N° BS3603, BS3736; BS1511, BS2418, BS1017, respectivamente) a la dilución de 1:200 durante toda una noche. Después de dos lavados de 10 minutos cada uno con tampón fosfato, se añadió un segundo anticuerpo biotinilado (IgG de cabra anti-conejo; Dako, dilución 1:100) durante una hora. Se lavaron dos veces con tampón fosfato y se utilizó el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 1 hora, y se efectuaron dos lavados con tampón fosfato. Como control negativo, se utilizaron secciones en las que no se añadió uno de los anticuerpos (primario, secundario o terciario) y en las que no se observó ninguna reacción positiva. En la última fase, la reacción inmunológica se reveló utilizando una solución de diaminobencidina al 0.005% (DAB; Sigma-Aldrich) y 0.003% de H_2O_2 . Todas las diluciones fueron realizadas utilizando tampón fosfato y 0.2% Tween 20, y las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente en cámaras húmedas. Al final del proceso, las secciones fueron deshidratadas, montadas y cubiertas con cubreobjetos.

Caracterización y especificidad de los anticuerpos

De acuerdo con la información técnica ofrecida por el fabricante (Bioworld Technology, MN, USA), los anticuerpos primarios utilizados, anticuerpos producidos en conejos, son dirigidos

Tabla 1. Puntuación de las lesiones colorrectales observadas en los cinco grupos experimentales de ratones. Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar

	n	Segmento del colon afectado	Ulceración	Severidad	Hiperplasia	Área involucrada	Puntuación total
Grupo A	4	Normal	0	0	0	0	0
Grupo B	4	Proximal, Medial, Distal	1	2.6 $\pm$ 0.23	2.8 $\pm$ 0.43	3.2 $\pm$ 0.33	9.6 $\pm$ 0.99
Grupo C	6	Medial, Distal	0	1.5 $\pm$ 0.18	2.7 $\pm$ 0.31	2.4 $\pm$ 0.17	6.6 $\pm$ 0.66
Grupo D	6	Medial, Distal	0	0.6 $\pm$ 0.14	1.1 $\pm$ 0.13	0.9 $\pm$ 0.20	2.6 $\pm$ 0.47
Grupo E	6	Normal	0	0	0	0	0

Tabla 2. Niveles (pg/mL) de IL-1 α , IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-4 y IL-17 en el suero de ratones. Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar

	IL-1 α	IL-2	IL-5	IL-6	IL-10	IFN- γ	TNF- α	GM-CSF	IL-4	IL-17
FR-91	0	0	20 $\pm$ 1.5	25 $\pm$ 2.5	0	0	0	78 $\pm$ 3.8	0	0
DSS	0	0	78 $\pm$ 4.5	48 $\pm$ 5.4	175 $\pm$ 4.5	363 $\pm$ 13.4	125 $\pm$ 9.7	0	0	1 $\pm$ 0.2
5%	0	55 $\pm$ 3.3	78 $\pm$ 3.9	53 $\pm$ 7.6	96 $\pm$ 10.1	0	0	0	0	24 $\pm$ 2.9
10%	0	34 $\pm$ 3.8	37 $\pm$ 2.1	149 $\pm$ 9	97 $\pm$ 8.6	0	0	41 $\pm$ 5.7	0	12 $\pm$ 1.7
20%	0	0	38 $\pm$ 3.9	47 $\pm$ 7.2	55 $\pm$ 5.8	15 $\pm$ 2.1	0	75 $\pm$ 4.4	0	17 $\pm$ 2.5

frente a epítomos de ratones y han sido purificados mediante la técnica de cromatografía de afinidad utilizando epítomos inmunógenos específicos con un grado de pureza superior al 95% (mediante SDS-PAGE). Su especificidad ha sido comprobada mediante la técnica de Western blot; reconociendo sólo una banda proteica de aproximadamente $\approx$ 86-90 kD (catenina- β), $\approx$ 43-45 kD (p53), $\approx$ 26-28 kD (BCL-2), $\approx$ 84-86 kD (MLH1) y $\approx$ 270-280 kD (APC). Además, los anticuerpos utilizados tenían un amplio espectro de reactividad cruzada y se demostró su expresión en ratones, ratas y humanos. Las lesiones se asumieron como positivas para catenina- β /BCL-2/MLH1/APC si se podía detectar coloración citoplasmática/nuclear, mientras que la p53 se consideró positiva al detectarse expresión nuclear. Para cuantificar el grado de daño del tejido, se analizaron al azar dos secciones microscópicas transversales por segmento y por animal. Un total de 6 secciones por animal fueron analizadas. El análisis cuantitativo del daño del tejido se realizó en cada sección utilizando un software de análisis de área/píxel (Pixcavator v2.4), para cuantificar el número de píxeles dentro del área dañada para cada sección colorrectal. Por lo tanto, el software fue utilizado para analizar el área ocupada por lesiones, comparado con la tinción de fondo y expresado en

de cada segmento colorrectal de cada ratón fueron codificadas y puntuadas para las lesiones de acuerdo a las lesiones ulcerosas (mucosa sin revestimiento epitelial: 0 no presente y 1 presente), severidad de las lesiones (inflamación y/o extensión fibrótica), hiperplasia (espesor del revestimiento epitelial) y al área afectada involucrada, puntuada de la siguiente manera: 0: normal; 1: débil; 2: moderada; y 3: severa. Los resultados fueron representados en las gráficas de la fig. 4.

Imágenes

Las secciones fueron fotografiadas utilizando un microscopio Olympus (BX50) equipado con una cámara digital (DP10). Las fotografías fueron convertidas en escala de grises y ajustadas por claridad y contraste mediante el software Corel Draw (Corel, Ottawa, Canada), y las figuras se computaron utilizando el software Corel Photo Paint.

Determinación del perfil de citoquinas Th₁/Th₂

La detección cuantitativa de GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF- α se realizó utilizando el FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10plex (BMS820FF) (Bender MedSystems®) que permitió analizar múltiples analitos en una alícuota individual de 50 μ L de suero de ratón. Unas microbolas fueron coloreadas con diferentes concentraciones de dos fluorocromos para generar distintos sets de bolitas. Cada bolita se cubrió con un anticuerpo específico para cada analito. El analito fue capturado utilizando un segundo anticuerpo biotinilado y marcado con estreptoavidina-ficoeritrina (S-PE). Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo (FAC-Scan, Becton Dickinson). Para el análisis de los resultados, se utilizó el FlowCytomix Pro Software (Bender MedSystems®).

Análisis de los resultados

Los datos de las secciones colorrectales estudiadas, obtenidos mediante el software (Pixcavator 2.4), fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) para detectar los mayores efectos entre grupos para cada parámetro. Se realizaron comparaciones *a posteriori* utilizando el test de Bonferroni/Dunn, con un nivel de significación de P<0.05.



En la formación y desarrollo de lesiones preneoplásicas y neoplásicas en el colon y recto, intervienen múltiples sustancias que se han introducido en el organismo

unidades porcentuales. El área del daño colorrectal en los ratones de los cinco grupos experimentales fue analizado y representado en gráficas (Fig. 3 y 4). Además, para cuantificar el nivel del daño en los ratones de cada grupo, dos diferentes observadores evaluaron de forma individual e independiente las secciones histológicas en doble ciego y obtuvieron un elevado nivel de similitud demostrando la misma puntuación observada en estudios anteriores⁹. Por lo tanto, tres secciones

Resultados

El tratamiento con FR-91 mejora la colitis aguda y crónica inducida por DSS. Resultados patológicos e inflamatorios.

En los grupos de ratones que recibieron repetidas dosis de DSS al 2% y baja o nula dosis de FR-91 (grupos B y C) se observó sangre en las heces durante la segunda mitad del experimento, mientras estos resultados no se observaron en los otros grupos. Macroscópicamente, se han identificado numerosas lesiones polipoides hiperplásicas (epitelio con características morfológicas atípicas de un diámetro de 0,5 cm) en los ratones de los grupos B (4/4; 100%) y C (5/6; 83,3%), principalmente en las porciones mediales y distales del segmento colorrectal; sólo algunas se han observado en el grupo D (1/6; 16,6%). Notablemente, en ninguno de los ratones pertenecientes al grupo E (DSS/20% FR-91), así como en el grupo control (A; 10 FR-91), se observaron procesos ulcerosos en el segmento del colon analizado. Estas observaciones macroscópicas fueron confirmadas en el análisis histológico de la morfología intestinal en las que se pudo enfatizar la integridad de la mucosa, la inflamación de la mucosa y submucosa del colon, la presencia de epitelio displásico y la presencia de úlceras. El examen histológico de secciones transversales teñidas con H&E (Fig. 2) evidenció la presencia de úlceras con moderadas o severas alteraciones morfológicas (áreas multifocales de inflamación en la submucosa o úlceras que se extendían en grandes áreas), la presencia de moderadas hasta severas criptas hiperplásicas (el espesor del revestimiento epitelial era dos o tres veces más que lo normal, con marcada hiper cromasia de las células y múltiples criptas con formaciones ramificadas), displasia epitelial (alteración en la diferenciación de las células epiteliales que pueden progresar hacia un carcinoma invasivo) y la presencia de grandes áreas con pérdidas de criptas. Sin embargo, la severidad de estas lesiones colorrectales fue significativamente diferente en los ratones de los distintos grupos, siendo los ratones pertenecientes al grupo B (DSS) los que presentaron el mayor grado de alteración, mientras los ratones pertenecientes al grupo C (DSS/5% FR-91) evidenciaron alteraciones moderadas hasta severas y los ratones del grupo D (DSS/10% FR-91) presentaron escasos signos de alteración. No se observaron lesiones características de colitis tanto en el grupo E (DSS/20% FR-91) como en el grupo control (A; 10% FR-91) (Fig. 2), de la misma forma que se ha descrito anteriormente con el examen macroscópico. Los resultados de las puntuaciones histológicas obtenidos mediante el examen de las lesiones colorrectales se presentan en la tabla 1 y en las figuras 3 y 4.

Inmunohistoquímica de catenina- β , p53, BCL-2, MLH1 y APC.

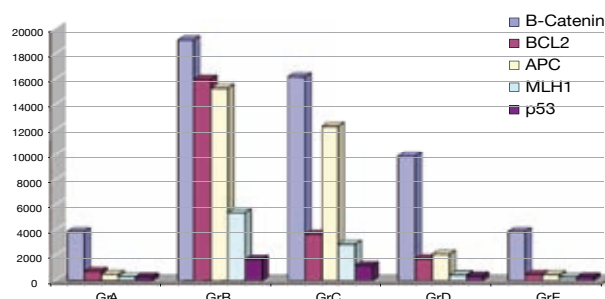
Las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas para identificar los marcadores celulares de las lesiones colorrectales demostraron la expresión de catenina- β (regulador celular de adhesión), BCL-2 (regulador de apoptosis), MLH1 (reparador de mal emparejamiento del ADN), APC y p53 (proteínas supresoras de tumor) en todas las lesiones de colon en los ratones. Mediante el marcaje con el anticuerpo de la porción colorrectal, se ha detectado la presencia de expresión endógena de

Para los biólogos experimentales los focos de criptas aberrantes FCA pueden ofrecer la oportunidad de identificar las alteraciones moleculares más tempranas que conducen al cáncer colorrectal (CCR)

catenina- β principalmente en el citoplasma de células displásicas y adenocarcinomas. Una intensa expresión de catenina- β fue observada en el colon proximal y medial (Fig. 5F) de los ratones del grupo B (DSS), mientras una moderada hasta intensa inmunoreactividad se observó en los segmentos colorrectales (Fig. 5K) de los ratones del grupo C (DSS/5% FR-91). Las células β -catenina inmunoreactivas (ir) fueron localizadas en las células displásicas de las criptas y en las células adenocarcinomas, en los estratos internos de las criptas (Fig. 5F, K). Las porciones colorrectales de los ratones de los grupos A, D, y E demostraron una débil o nula presencia de reacción frente a la catenina- β en las células de las criptas (Fig. 5A, P, U), y estos valores se consideraron como valores basales de la expresión de la catenina- β . Se observaron células BCL-2-ir y p53-ir en las porciones colorrectales de los ratones pertenecientes a los grupos B (Fig. 5G, J) y C (Figuras 5L, O), en las que pudo observarse una intensa reacción en las células adenocarcinomas y en las células de las criptas, particularmente evidente en los ratones

Fig. 4. Análisis de imágenes del valor medio de inmunoreactividad del área del colon dañada. En el grupo 5 se han observado diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a los otros grupos tratados (3 y 4), y valores similares también al grupo control (grupo 1)

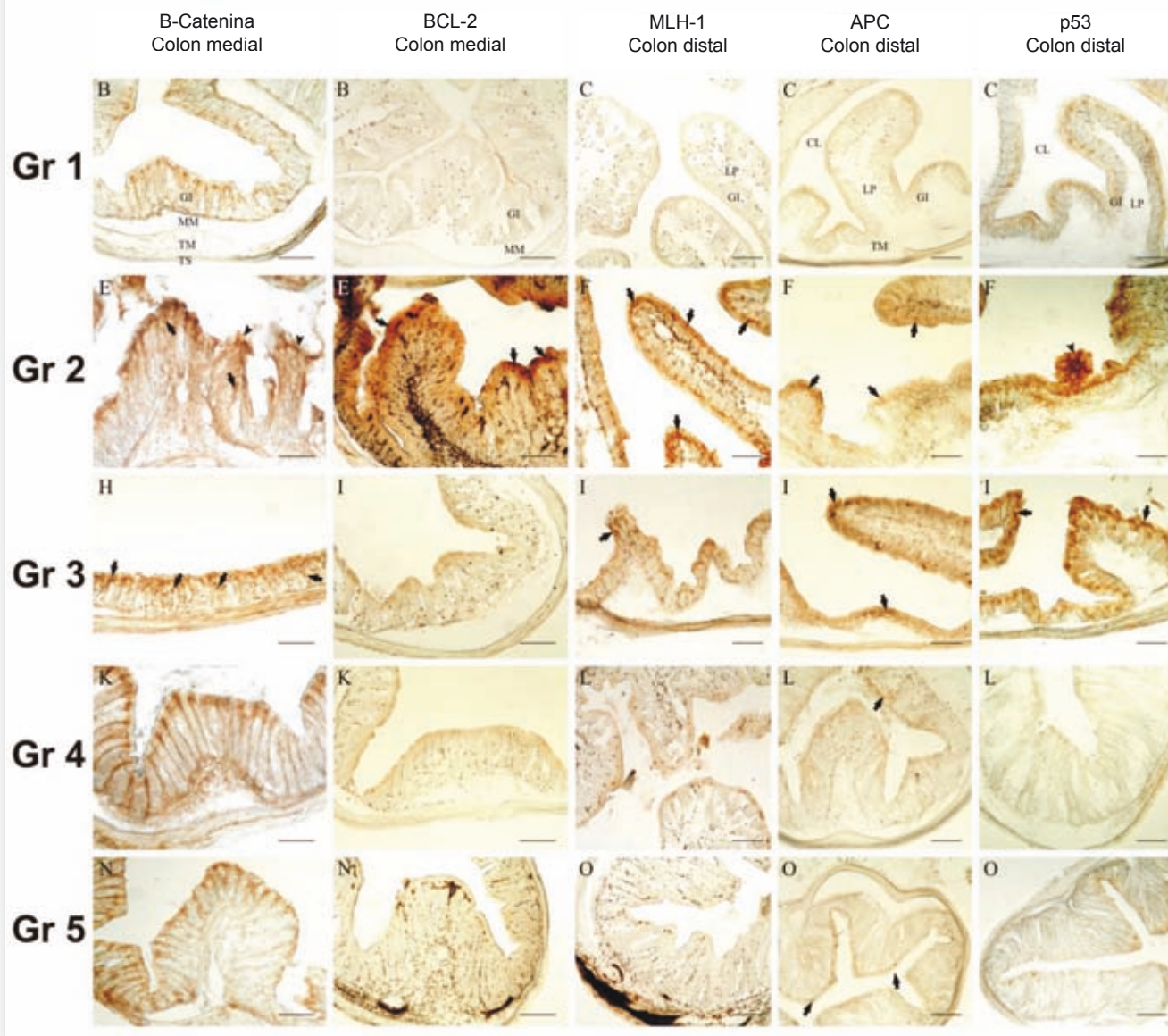
Áreas del colon inmunorreactivas



del grupo B. La inmunoreactividad a la BCL-2 y a la p53 estaba ausente en las secciones colorrectales de los ratones de los grupos A, D, y E estudiados (Fig. 5B, Q, E, T, Y). Una fuerte tinción a MLH1-ir se observó en células de los segmentos colorrectales en los ratones del grupo B (Fig. 5H) y del grupo C (Fig. 5M), demostrando una intensa reacción en las células adenocarcinomatosas y

en las células de las criptas del epitelio displásico, particularmente intensa en los ratones del grupo B. No se observaron células MLH1-ir en las secciones colorrectales de los ratones de los grupos A, D y E (Fig. 5C, R, W). La inmunoreactividad observada frente a la proteína APC fue muy intensa en todas las porciones colorrectales de los ratones de los grupos B (Fig. 5I) y C (Fig. 5N), a pesar

Fig. 5. Inmunohistoquímica de los marcadores patológicos del colon en diferentes secciones transversales del colon. En las figuras A-E se muestran detalles de las secciones transversales a nivel del colon medial y distal de los ratones del grupo A, que demuestran una escasa inmunoreactividad a catenina- β , p53 o ausencia frente a BCL-2, MLH-1 y APC. Se puede observar que estas secciones también muestran una organización epitelial normal con células de las criptas bien diferenciadas. Las figuras F-J se corresponden con detalles de las secciones transversales de los ratones del grupo B, mostrando una intensa inmunoreactividad con los marcadores utilizados. Es posible observar la presencia de numerosas células inmunoreactivas (flechas en las figuras F-I) y su masiva localización a nivel de las diferentes lesiones patológicas, así como la presencia de un nivel severo de displasia (puntas de flecha en la figura F), pólipos (punta de flecha en la figura J) y adenomas. Las figuras K-O muestran detalles de las secciones transversales de los ratones del grupo C, mostrando la presencia de escasa o moderada inmunoreactividad con los marcadores utilizados en los segmentos colorrectales. Es posible observar la presencia de algunas células inmunoreactivas a la catenina- β (puntas de flecha en la figura K), MLH-1 (flecha en la figura M), APC (flechas en la figura N) y p53 (flechas en la figura O). Las figuras P-T y U-Y se corresponden con las secciones transversales de los ratones del grupo D (P-T) y grupo E (U-Y) mostrando ausencia o inmunoreactividad basal (flechas en las figuras S y X) de los segmentos colorrectales estudiados con los marcadores celulares utilizados. Barra de escala: 100 μ m



de que las células de la cripta de los ratones del grupo B demostraban una mayor positividad. Las porciones colorrectales de los ratones de los grupos A, D, y E demostraron sólo una débil reactividad frente a la proteína APC en sus células de las criptas (Fig. 5D, S, X). La incidencia de lesiones del colon demostrada con estos marcadores celulares en el grupo E fue del $8.2\% \pm 4\%$, mientras fue del $38.2\% \pm 6\%$, $33.3\% \pm 6\%$ y $20.4\% \pm 3\%$ en los grupos B, C y D, respectivamente (Fig. 3 y 4). Una incidencia histológica similar fue observada en los ratones del grupo E cuando se comparó con el grupo control A ($7.8\% \pm 2\%$). Significativas diferencias fueron observadas entre los grupos experimentales A/E y B/C/D mediante análisis estadístico ANOVA de dos factores de los datos de los marcadores inmunohistológicos en la porción colorrectal (Fig. 4). El grupo E fue el grupo más resistente a las lesiones inducidas por DSS en la porción colorrectal, indicado por el valor más bajo de reactividad observada por cada biomarcador utilizado, valor similar al observado en el grupo control A. Los grupos B, C, y D demostraron mayor susceptibilidad a las lesiones inducidas por DSS, demostrado por la presencia de valores más elevados de reactividad. Diferencias significativas entre grupos fueron observadas entre los grupos A/E y B/C/D en la susceptibilidad al DSS, correlacionándose con las diferencias entre los valores medio de consumo de FR-91.

Producción de citoquinas inflamatorias inducidas por DSS

Se han considerado los mecanismos potenciales que pueden estar relacionados con la colitis que se obtiene mediante tratamiento con DSS y el efecto del compuesto FR-91 en los grupos de ratones tratados. Como se evidencia en la Tabla 2, el tratamiento con DSS aumentó sólo la síntesis y liberación de la citoquina proinflamatoria IFN- γ . No se observaron cambios significativos en la síntesis y liberación de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-17 tanto en los grupos tratados como en los grupos control.

Discusión

El ambiente externo, el perfil genético, el sistema inmunológico y la flora intestinal son factores que contribuyen a formar una compleja red en la que todos están integrados y participan en la formación de reacciones de inflamación crónica que son características de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). Entre todos estos factores, los más importantes son los genéticos y los que contribuyen a un correcto funcionamiento del sistema inmunológico, que actúan a nivel de la mucosa intestinal con el objetivo de prevenir sus alteraciones y/o rupturas y el consecuente desarrollo de procesos de inflamación crónica. Diferentes medicamentos son capaces de bloquear



moléculas clave que contribuyen a la aparición de procesos de inflamación crónica utilizando diferentes caminos. Sin embargo, debido a que los mecanismos patogénicos de la IBD son muy complejos e involucran diferentes factores, es razonable pensar que los caminos que dan lugar a la inflamación puedan desempeñar diferentes papeles en diferentes pacientes. Estos factores deberían ser considerados a la hora de elegir nuevos procedimientos terapéuticos disponibles en la actualidad para ser utilizados en pacientes con IBD, de manera especial cuando se utilizan agentes biológicos o inmunosupresores. Estos tratamientos muy fuertes pueden dar lugar a efectos secundarios, en particular a infecciones y a un aumento del riesgo de padecer procesos tumorales. Además, a veces no son útiles para el tratamiento de determinados subgrupos de pacientes. Como consecuencia directa de estas situaciones, nos enfrentamos a una creciente necesidad de nuevos compuestos que sean capaces de mejorar el efecto terapéutico y, al mismo tiempo, de reducir la aparición de efectos secundarios.

Los intestinos grueso y delgado actúan como barreras importantes en contra de agentes exógenos, en particular frente a sustancias con capacidad mutagénica y carcinogénica

Se han identificado más de 20.000 compuestos bioactivos sintetizados por microorganismos, y más de 10.000 de estos metabolitos secundarios son producidos por actinomicetos, representando alrededor de un 45% de todos los compuestos con actividad biológica conocida¹⁰. Entre los actinomicetos, alrededor de 8.000 compuestos están sintetizados por la especie *Streptomyces*¹¹. La función principal de estos compuestos es su actividad antibiótica. Además, muchos de estos compuestos, como por ejemplo las antraciclinas

“

(aclerubicina, daunomicina y la doxorubicina), péptidos (bleomicina y actinomicina D), enidinas (neocarzinostatina), antimetabolitos (pentostatina), carzinofilina, mitomicinas y otros^{12,13} han sido testados para la inhibición de la carcinogénesis inducida químicamente en modelos animales tanto *in vitro* como *in vivo*¹³.



El compuesto FR-91 posee la capacidad de prevenir la formación de lesiones pretumorales en modelos murinos de colitis, inhibiendo el desarrollo de tumores colorrectales

En el presente estudio, hemos investigado el efecto del FR-91, un lisado estandarizado de células bacterianas pertenecientes al género *Bacillus* que en anteriores estudios, ha demostrado tener significativas propiedades inmunorreguladoras¹⁴ en la inflamación del colon, inducida tras la exposición a un tratamiento de 8 semanas con DSS en agua de beber, y en particular, en la capacidad de interferir en la aparición y/o progresión del cáncer de colon.

Los resultados obtenidos demuestran que un tratamiento de seis semanas con este compuesto da lugar a una ligera reducción en las lesiones colorrectales a baja dosis (5% FR-91) y una moderada o completa reducción a dosis más elevadas (10-20% FR-91). Además, los datos histopatológicos han demostrado que el FR-91 no presenta efectos patológicos sobre la organización morfológica del tejido del colon de los ratones, datos que han podido observarse cuando el FR-91 fue administrado durante todo el período experimental.

Los datos obtenidos sugieren que el FR-91 puede ser un importante agente quimiopreventivo frente a procesos tumorales de colon en ratones.

En nuestros experimentos inducimos un amplio espectro de lesiones colorrectales con el fin de evaluar los efectos anticancerígenos del FR-91 en ratones con colitis ulcerosa crónica. La administración repetida de DSS como inductor de lesiones en modelos murinos de colitis ha sido ampliamente descrita¹⁵⁻²⁰, siendo esencial para la comprensión de las complejas interacciones entre ambiente, genética, y disfunción de la barrera epitelial en la IBD^{8,9,21}. En el presente estudio, el uso de DSS en el agua durante ocho semanas ocasionó un daño epitelial y una importante respuesta inflamatoria, consiguiéndose por lo tanto un eficaz modelo de daño agudo al colon para testar el tratamiento de seis semanas con FR-91. Nuestros resultados demuestran que la mejor dosis-respuesta se obtuvo en el grupo E utilizando la concentración de FR-91 al 20%, grupo en el que no se observaron ni alteraciones histológicas ni otro tipo de lesiones.

La tinción histológica rutinaria^{9,22-24} y con marcadores pre-tumorales^{9,20,23,25}, utilizada para evaluar la severidad de las lesiones, ha confirmado el efecto protector del FR-91 frente a la reacción inflamatoria ocasionada por el tratamiento con DSS. También analizamos concentraciones más bajas de FR-91 en el agua en ratones tratados durante ocho semanas, obteniendo una aparición gradual de lesiones directamente proporcional a la disminución de la concentración del FR-91, y obtuvimos resultados histológicos similares a los ratones de los grupos no tratados. **Estos datos sugieren, por lo tanto, una acción quimiopreventiva frente a los procesos de cancerogénesis, sin interferir con las estructuras epiteliales sanas del colon de los ratones.**

Se han observado alteraciones en la producción de muchas citoquinas en pacientes con IBD²⁶. A pesar de que el impacto real de estos descubrimientos en la patogénesis de la IBD se mantenga aún controvertido, no está claro si se trata de factores primarios o secundarios involucrados en la regulación del sistema inmunológico de la mucosa intestinal. De todas formas estas citoquinas pueden ser consideradas como marcadores muy interesantes a la hora de diferenciar entre pacientes. En fases activas de IBD, un desequilibrio entre células reguladoras y células efectoras, que mayoritariamente involucran células efectoras T (Th₁ y Th₂) y células reguladoras (Tregs, Th₃). La enfermedad de Crohn (CD) está asociada con un perfil de citoquinas Th₁, que incluye IFN- γ , TNF- α , y IL-12, mientras la UC está asociada a un tipo de respuesta modificada Th₂ que incluye IL-15 e IL-10²⁷. Estas observaciones han sido recientemente complementadas con el descubrimiento del eje IL-23/IL-17 como parte de la respuesta inmunológica T efectora, y parece estar involucrado en la IBD. Los niveles de expresión de IL-23 e IL-17 se encuentran elevados en pacientes con IBD²⁸.

A pesar de que la identificación de la acción metabólica específica del FR-91 en la prevención y tratamiento de la colitis necesita ulteriores investigaciones, hemos demostrado que el compuesto FR-91 posee la capacidad de prevenir la formación de lesiones pretumorales en modelos murinos de colitis, inhibiendo el desarrollo de tumores colorrectales. El FR-91 parece ser un compuesto que requiere la debida atención en ulteriores estudios de prevención de procesos tumorales del colon.

Abreviaturas

CL, criptas de Lieberkühn; d, porción distal del colon; GI, glándulas intestinales; Gr A-E, grupos A-E; LP, lámina propia; m, porción intermedial del colon; MM, muscularis mucosa; p, porción proximal del colon; TM, túnica muscularis externa. TS, túnica serosa.



DEFIÉNDASE del MAL

“**AntiGan®** es un nuevo complejo lipoproteico extraído de la especie *C. conger* con propiedades inmunopotenciadoras y reguladoras del crecimiento celular”



LA SALUD QUE VIENE DEL MAR


ebiotech

+34 902 103 726
www.ebiotech.com

Conclusiones

Los protocolos experimentales de inducción de cáncer de colon abren una serie de posibilidades para el biólogo experimental. Por un lado, permiten avanzar en el estudio de los mecanismos de formación de focos de criptas aberrantes (FCA), lesiones pre-neoplásicas que se cree corresponden a las primeras manifestaciones de procesos carcinogénicos posteriores. El protocolo de inducción de inflamación crónica mediante administración de DSS, utilizado en el presente estudio, permite además la posibilidad de examinar el efecto de agentes preventivos putativos que inhiban la formación de estas displasias colónicas y avanzar así dentro de nuevas intervenciones terapéuticas. El FCA es especialmente válido como biomarcador de efecto para ensayar productos naturales a los que se puede atribuir propiedades antitumorales. Por otra parte, en el presente estudio, se ha propuesto un modelo para evaluar la progresión de tumores inducidos por DSS y explorar posibilidades de modulación del proceso, así como de prevención en la formación de neoplasias en colon, mediante el uso del FR-91. Los resultados presentados demuestran diferencias significativas en los grupos tratados con FR-91 y apoyan la realización de ulteriores estudios, centrados en la prevención y/o tratamiento, para profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen al desarrollo del cáncer de colon. ■



Valter R.M. Lombardi
biotecnologia@ebiotec.com

Referencias Bibliográficas:

1. Keohane J, O'Mahony C, O'Mahony L et al. Irritable bowel syndrome-type symptoms in patients with inflammatory bowel disease: a real association or reflection of occult inflammation? *Am J Gastroenterol* 2010; 105:1788-94.
2. Scaldaferri F, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis. *J Dig Dis* 2007; 8:171-8.
3. Harpaz N, Polydorides AD. Colorectal dysplasia in chronic inflammatory bowel disease: pathology, clinical implications, and pathogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134:876-95.
4. Dotan I. Disease behavior in adult patients: are there predictors for stricture or fistula formation? *Dig Dis* 2009; 27:206-11.
5. Elson CO. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 109:1344-67.
6. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98:694-702.
7. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69:238-49.
8. Tanaka T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog* 2009; 8:5.
9. Birkenmeier EH, Torrey A, Sundberg JP. Chromosomal location of modifier genes determining sensitivity of mice to dextran sulphate sodium. In: Tytgat G, Bartelsman J, van Deventer S (Eds). *Inflammatory Bowel Disease*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1995:401-7.
10. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 2005; 58:1-26.
11. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 2007; 70:461-77.
12. Olano C, Méndez C, Salas JA. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep* 2009; 26:628-60.
13. Demain AL, Sánchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot* 2009; 62:5-16.
14. Lombardi VR, Martínez E, Chacón R, et al. Effects of FR-91 on immune cells from healthy individuals and from patients with non-Hodgkin lymphoma. *J Biomed Biotechnol* 2009. doi:10.1155/2009/187015.
15. Cho JY, Chang HJ, Lee SK et al. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of beta-caryophyllene, a sesquiterpene. *Life Sci* 2007; 80:932-9.
16. Araki Y, Mukaisyo K, Sugihara H et al. Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Oncol Rep* 2010; 24:869-74.
17. Huang TC, Tsai SS, Liu LF et al. Effect of *Arctium lappa* L. in the dextran sulfate sodium colitis mouse model. *World J Gastroenterol* 2010; 16:4193-9.
18. Choi SY, Hur SJ, An CS et al. Anti-inflammatory effects of *Inonotus obliquus* in colitis induced by dextran sodium sulfate. *J Biomed Biotechnol* 2010. doi:10.1155/2010/943516.
19. Whitem CG, Williams AD, Williams CS. Murine colitis modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS). *J Vis Exp* 2010. doi:10.3791/1652.
20. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R et al. Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in Apc(Min/+) mice: inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int J Cancer* 2006; 118:25-34.
21. Nell S, Suerbaum S, Josenhans C. The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:564-77.
22. Darsigny M, Babeu JP, Dupuis AA et al. Loss of hepatocyte-nuclear-factor-4alpha affects colonic ion transport and causes chronic inflammation resembling inflammatory bowel disease in mice. *PLoS One* 2009. doi:10.1371/journal.pone.0007609.
23. Wang JG, Wang DF, Lv BJ et al. A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium. *World J Gastroenterol* 2004; 10:2958-62.
24. Mähler M, Bristol IJ, Leiter EH et al. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am J Physiol* 1998; 274:44-51.
25. Cruickshank SM, English NR, Felsburg PJ et al. Characterization of colonic dendritic cells in normal and colitic mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11:6338-47.
26. Yamamoto T, Umegae S, Kitagawa T et al. Systemic and local cytokine production in quiescent ulcerative colitis and its relationship to future relapse: a prospective pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11:589-96.
27. Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006; 12:4807-12.
28. Nielsen OH, Kirman I, Rüdiger N et al. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38:180-5.