

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en
Ciencias Biológicas

**ESTUDIOS MOLECULARES Y
CELULARES DEL SISTEMA DE
ENDOTELINAS EN CÁNCER
COLORRECTAL**

Mariana Bianchi

Director de Tesis: Dr. Víctor Hugo Casco

Codirector de Tesis: Dr. Javier Fernando Adur

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

Facultad de Ingeniería – UNER

-2017-

Agradecimientos

Quiero expresar un profundo agradecimiento al Dr. Víctor Hugo Casco, director de esta tesis, por haberme permitido unirme a su grupo de trabajo, por sus consejos, sus aportes sus correcciones y su paciencia.

Al Dr. Javier Adur, codirector de esta tesis, por sus continuos aportes a la investigación, por su compañerismo y sus consejos.

A la Universidad Nacional del Litoral por brindarme la posibilidad de formarme como profesional y ciudadana, desde mis estudios secundarios como Técnica Química en la Escuela Industrial Superior, luego en mis estudios de grado como Lic. En Biotecnología y finalmente en mis estudios de posgrado en el Doctorado en Ciencias Biológicas, ambas carreras de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Estaré eternamente agradecida a esta institución por brindarme educación pública, gratuita y de gran calidad.

A la Universidad Nacional de Entre Ríos, particularmente a la Facultad de Ingeniería por brindarme sus instalaciones para el desarrollo de esta tesis y los subsidios necesarios para financiar la misma. Además, por brindarme la oportunidad de formar parte de dicha institución como docente e investigadora.

A CONICET, por otorgarme las becas de posgrado que han posibilitado el desarrollo de la presente tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Microscopía Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares, en especial a Fernanda, Carolina, Quique y Silvana, entre otros; por su ayuda en el desarrollo experimental de esta tesis y a los demás por sus aportes en los seminarios, los momentos compartidos, los asados y los mates.

A mis compañeros de la Cátedra de Química y de la Facultad de Ingeniería, por las risas, las charlas y la buena onda.

A mis amigos, los de antes y los que conocí en Oro verde, tengo la suerte de tenerlos en mi vida, y aunque muchos ya no vivan cerca ni podamos vernos todos los días como antes, son mi gran familia de corazón.

A mi familia, a mis padres Adriana y Silvio, a Camila, Germán, Augusto, María y Lola, y a mi abuela Anita, por el apoyo y el cariño.

A Germán, por brindarme su apoyo incondicional, por ser un gran compañero de vida, por cuidarme y quererme, y por compartir nuevos proyectos y aventuras, haciendo de mi mundo, un lugar más divertido todos los días.

Trabajos publicados

Parte de los resultados discutidos en la presente tesis dieron origen a cuatro publicaciones internacionales con referato:

Publicaciones:

1. M Bianchi, JF Adur, SY Ruff, MF Izaguirre, HF Carvalho, CL Cesar, VH Casco (2014). Mouse colorectal cancer an early detection approach using nonlinear microscopy. *Biomed Mater Eng* 24 (6): 3419–3426.
2. JF Adur; M Bianchi, VB Pelegati, S Viale, MF Izaguirre, HF Carvalho, CL Cesar, VH Casco (2014). Colon Adenocarcinoma Diagnosis in Human Samples by Multicontrast Nonlinear Optical Microscopy of Hematoxylin and Eosin Stained Histological Sections. *J Cancer Ther* 5 (13): 1259-1269.
3. M Bianchi, JF Adur, MF Izaguirre, S Viale, CL Cesar, VH. Casco (2013). Endothelin-2 Differential Expression in Normal and Early-Stages of Colon Cancer Development. *J Cancer Ther* 4(6): 26-33.
4. M Bianchi, JF Adur, S Takizawa, K Saida, VH Casco (2012). Endothelin system in intestinal villi: A possible role of endothelin-2/vasoactive intestinal contractor in the maintenance of intestinal architecture. *Biochem Biophys Res Commun* 417(4): 1113–1118.

Índice

Agradecimientos	1
Trabajos publicados	2
Abreviaturas y símbolos.....	7
Resumen.....	10
Summary	13
1. Introducción.....	16
1.1 Biología general del sistema de Endotelinas.....	17
1.1.1 Generalidades de los ligandos	17
1.1.2 Genes de Endotelinas	18
1.1.3 Ruta biosintética.....	20
1.1.4 Catabolismo.....	21
1.1.5 Biología molecular de los receptores	21
1.1.6 Localización y señalización.....	22
1.1.7 Regulación de las Endotelinas.....	23
1.1.8 Funciones de las ET	24
1.2 Familia de los péptidos natriuréticos.....	25
1.3 Tracto gastrointestinal normal.....	26
1.3.1 Anatomía general del tracto gastrointestinal en mamíferos	26
1.3.2 Anatomía e histología del Intestino grueso de mamíferos	27
1.4 Endotelinas en el tracto gastrointestinal.....	29
1.5 Antecedentes del sistema de las endotelinas en el colon.....	30
1.6 Péptidos natriuréticos en el tracto gastrointestinal	30
1.7 Cáncer colorrectal	31
1.7.1 Neoplasia.....	31
1.7.2 Focos de Criptas Aberrantes (FCA).....	32
1.7.3 Secuencia adenoma-cáncer.....	32
1.7.4 Displasia.....	33

1.7.5	Adenocarcinoma intramucoso.....	34
1.7.6	Adenocarcinoma invasivo.....	34
1.7.7	Estadificación anatomopatológica del cáncer colorrectal.....	35
1.8	Modelos murinos de CCR.....	36
1.9	Sistema Endotelinas en cáncer.....	38
1.9.1	Receptores de las ET en cáncer.....	38
1.9.2	ET-1 en cáncer.....	39
1.9.3	ET-2 en cáncer.....	39
1.10	El sistema de las Endotelinas en el cáncer colorrectal.....	40
1.10.1	Receptores de las ET en el cáncer colorrectal.....	40
1.10.2	ET-1 en cáncer colorrectal.....	40
1.10.3	ET-2 en cáncer colorrectal.....	41
1.11	Péptidos natriuréticos en el cáncer.....	41
2.	Hipótesis.....	43
3.	Objetivos.....	44
3.1	Generales.....	44
3.2	Específicos.....	44
4.	Materiales y métodos.....	45
4.1	Modelo experimental.....	45
4.1.1	Animales.....	45
4.1.2	Obtención de los segmentos intestinales.....	46
4.1.3	Inducción del cáncer colorrectal por tratamiento con Azoximetano/sulfato de sodio dextrano (AOM/SSD).....	46
4.2	Técnicas de microscopia.....	47
4.2.1	Instrumentación.....	47
4.2.2	Estudios histológicos y de inmunofluorescencia.....	49
4.2.3	Registro de las imágenes.....	53
4.2.4	Análisis por microscopia óptica no lineal (MONL).....	53

4.2.5	Obtención de imágenes y cuantificación de la señal SHG	54
4.3	Análisis de la expresión génica de usando RT- <i>sq</i> PCR.....	56
4.3.1	Extracción del ARN	56
4.3.2	Transcripción reversa	56
4.3.3	Cebadores y amplificación	57
4.3.4	Cuantificación	58
4.4	Análisis estadístico.....	58
5.	Resultados.....	60
5.1	Animales normales.....	60
5.1.1	Análisis histológico	60
5.1.2	Análisis bidimensional cualitativo y cuantitativo del colágeno por MONL	61
5.1.3	Análisis de la expresión génica de las ET	63
5.1.4	Análisis de inmunolocalización de las ET	64
5.1.5	Análisis de expresión génica e inmunolocalización de los péptidos natriuréticos 68	
5.2	Modelo de inducción del CCR con AOM/SSD.....	71
5.2.1	Cuarta semana del tratamiento con AOM/SSD.....	72
5.2.2	Octava semana del tratamiento con AOM/SSD	81
5.2.3	Decimosexta semana del tratamiento con AOM y SSD.....	90
5.2.4	Vigésima semana del tratamiento con AOM/SSD	99
6.	Discusión y conclusiones	108
6.1	Estudios en el colon en condiciones fisiológicas normales.....	111
6.1.1	El sistema de las endotelinas	111
6.1.2	Péptidos natriuréticos	113
6.1.3	Endotelinas y péptidos natriuréticos en el colon normal.....	114
6.2	Desarrollo de cáncer colorrectal inducido.....	120
6.2.1	Fisiopatología del CCR en el modelo AOM/SSD.....	121
6.2.2	En CCR, ET-2 es indetectable en el colon distal.....	123

6.2.3	ET-1 y receptores en el desarrollo del CCR.....	125
6.2.4	Péptidos natriuréticos en el desarrollo del CCR.....	127
6.2.5	Roles de las endotelinas y péptidos natriuréticos en CCR	129
6.2.6	MNL como herramienta para la detección temprana del CCR	137
7.	Bibliografía.....	139

Abreviaturas y símbolos

AA	Azul Alciano
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANP	Péptido natriurético atrial (del inglés <i>Atrial Natriuretic Peptide</i>)
AOM	Azoximetano
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BNP	Péptido natriurético cerebral (del inglés <i>Brain Natriuretic Peptide</i>)
CARS	Dispersión Raman Anti-Stokes Coherente (del inglés <i>Coherent Anti-Stokes Raman Scattering</i>)
CCR	Cáncer colorrectal
CD	Colon distal
CNP	Péptido natriurético tipo C (del inglés <i>C-type Natriuretic Peptide</i>)
col	Colaboradores
CP	Colon proximal
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
ET	Endotelina/s
ET-1	Endotelina 1
ET-2	Endotelina 2
ET-3	Endotelina 3
ET _A	Receptor de endotelina A

ET _B	Receptor de endotelina B
FCA	Foco de cripta aberrante
FFT	Transformada rápida de Fourier (del inglés <i>Fast Fourier Transform</i>)
GMPc	Guanina monofosfato cíclico
H	Hora, horas
H&E	Hematoxilina y eosina
Kg	Kilogramo
Mg	Miligramo
ml	Mililitro
MONL	Microscopia óptica no lineal
NPR –A	Receptor de péptido natriurético A (del inglés <i>Natriuretic Peptide Receptor A</i>)
NPR –B	Receptor de péptido natriurético B (del inglés <i>Natriuretic Peptide Receptor B</i>)
PAS	Coloración de ácido peryodico de Schiff (del inglés <i>Periodic Acid-Schiff</i>)
Pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Ph	Potencial Hidrógeno
PN	Péptido/s natriurético/s
PPET	Preproendotelina

RA	Relación de aspecto
ROI	Región de interés (del inglés <i>Region Of Interest</i>)
RT- <i>sq</i> PCR	Retrotranscripción seguida de PCR semicuantitativa
SHG	Generación de segundo armónico (del inglés <i>Second-Harmonic Generation</i>)
SSD	Sulfato de sodio dextrano
THG	Generación de tercer armónico (del inglés <i>Third-Harmonic Generation</i>)
TPEF	Fluorescencia de excitación bifotónica (del inglés <i>Two Photon Excitation Microscopy</i>)
°C	Grado centígrado
μl	Microlitro

Resumen

Las endotelinas (ET) son moléculas intermediarias que cumplen roles importantes en una serie de procesos fisiológicos y fisiopatológicos fundamentales. Entre éstos se pueden destacar su participación en trastornos cardiovasculares, cicatrización de heridas, patologías pulmonares, enfermedades renales, procesos cancerosos, inmunidad e incluso la neurotransmisión, entre otros.

Muchos de sus roles permanecen aún pobremente comprendidos, por lo que, en esta tesis, se estudió y revisó la biología molecular y celular de las mismas tanto en la regulación de la función del colon normal como en el desarrollo del cáncer colorrectal (CCR). El estudio de las endotelinas se complementó con el de los péptidos natriuréticos (PN) ANP y CNP, dos antagonistas naturales del sistema de las endotelinas.

En esta tesis se determinó que, en condiciones normales, las ET-1 y ET-2 se expresan diferencialmente en las distintas regiones del colon. ET-1 es la principal isoforma encontrada en el colon distal, mientras que ET-2 predomina en el colon proximal. La inmunolocalización de ET-1 es amplia y exhibe una distribución variable en las distintas regiones estudiadas. Este péptido se detectó a nivel del citosol y en ocasiones en el núcleo de las células del epitelio colónico, en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, en las musculares y en las del sistema inmunitario. Por su parte, ET-2 presenta una localización más restringida. Esta isoforma muestra una particular variabilidad en el epitelio del colon proximal, localizándose en el tercio inferior de las criptas de Lieberkühn, aunque también se verifica marcación en el tercio superior y en algunas secciones, a lo largo de toda la cripta. Por el contrario, en el colon distal, su localización se da exclusivamente en el tercio inferior de las criptas.

El principal receptor de endotelinas en tejidos normales es el ET_B, el cual se localiza principalmente en los núcleos de las células de la mucosa, tanto en colon proximal como en el distal, aunque también pudo detectarse en linfocitos y células musculares. El receptor ET_A, exhibe una débil expresión génica en ambos segmentos, aunque muestra una amplia localización. La marcación es citosólica, principalmente en el tercio inferior de las criptas de Lieberkühn.

En el colon, se demostró la expresión génica de los péptidos natriuréticos estudiados. Sus niveles de expresión fueron similares en ambos segmentos y su localización se encontró principalmente en el citoplasma del tejido mucoso, en el colon proximal y en los núcleos del mismo tejido, en el colon distal.

El análisis de los resultados en animales normales reveló que tanto endotelinas como péptidos natriuréticos exhiben una distribución que permite postular que estarían involucrados en el

mantenimiento de las propiedades mecánicas de las criptas del colon. ET-1 es sintetizada y presenta receptores en los fibroblastos subepiteliales y su acción sobre los mismos contribuiría al mantenimiento del fenotipo plano, lo que favorecería tanto su contractilidad citoplasmática como el mantenimiento de la tensión. Tal fenotipo es abundante en la base de las criptas de Lieberkühn, mientras que hacia el extremo apical de las mismas, predomina el fenotipo estrellado, que exhibe una menor respuesta mecánica a las tensiones generadas en el colon. Dada la distribución de ET-2, en esta tesis se postula que esta isoforma estaría reforzando los efectos de ET-1. Una hipótesis similar fue propuesta en las vellosidades de intestino delgado, en las que la distribución de ET-2 coincide con el fenotipo plano de los fibroblastos.

Otra función de las ET y los PN, es la que los relaciona con la absorción epitelial de agua y sales. La resistencia del epitelio colónico varía en los distintos segmentos, incrementándose hacia el colon distal, lo que permite la reabsorción de agua y sales de las heces. En este aspecto, las endotelinas están íntimamente relacionadas a la regulación de transportadores iónicos. Adicionalmente, tanto las ET como los PN están involucrados en la motilidad intestinal y en la respuesta inmune del colon ante posibles injurias, función que se ve especialmente incrementada durante el desarrollo del CCR.

Para la inducción del cáncer colorrectal se utilizó el carcinógeno azoximetano, complementado con sulfato de sodio dextrano. Los análisis se realizaron extrayendo muestras en las semanas cuarta, octava, decimosexta y vigésima, contadas desde el inicio de la experiencia, de acuerdo a un protocolo que ha probado reproducir la evolución de la patología [1]. Mediante el empleo de técnicas histológicas clásicas, se observó una progresión en la formación de los tumores, desde un estado inflamatorio que favoreció el desarrollo de focos de criptas aberrantes en las primeras semanas de la inducción, hasta la formación de carcinomas intramucosos en las últimas semanas del experimento. El modelo se reprodujo según las características reportadas en la literatura. Los procesos tumorales se generaron principalmente en el colon distal, exhibiendo un alto grado de infiltración de células inmunes y muy excepcionalmente se verificó la formación de un carcinoma invasivo. Complementando el análisis histológico cualitativo, se utilizaron técnicas de microscopía óptica no lineal para analizar el grado de ordenamiento de las fibras colágenas en la matriz extracelular. En tal estudio, mediante el uso de microscopía de generación de segundo armónico, se lograron detectar y cuantificar las modificaciones de dicha estructura desde el inicio del proceso, lo que permite postular esta tecnología como método para la detección temprana del proceso maligno.

En el contexto experimental del CCR inducido, el sistema de las endotelinas exhibe modificaciones notables en sus perfiles de expresión. Uno de los hallazgos de mayor relevancia lo constituye la remisión de la expresión de ET-2 en el colon distal, desde el primer estadio

estudiado (S4) y, dicha situación se reprodujo en el colon proximal a medida que el proceso canceroso se extendió hacia ese segmento (S20). Esto pudo observarse a nivel de expresión génica y del péptido. La abrupta represión de su expresión es interpretada como desencadenante de la anulación de la segmentación de los distintos fenotipos fibroblásticos a lo largo del estroma que recubre a las criptas de Lieberkühn. En relación con ET-1, este péptido no exhibió modificaciones significativas en sus niveles de expresión en los primeros estadios (S4 y S8), aunque sí se verificó una disminución de los mismos en los últimos (S16 y S20). Sin embargo, en el colon distal, desde el primer estadio, la disminución en la expresión génica de ET_B, receptor relacionado a la depuración de las ET, podría incrementar la vida media de ET-1, potenciando sus efectos. La localización de dicho péptido en las condiciones patológicas se da en las células ubicadas en las regiones lesionadas (focos de criptas aberrantes, microadenomas, adenomas y adenocarcinomas) y en los linfocitos infiltrantes, exhibiendo una marcación principalmente citoplásmica, aunque en ocasiones también se observa localización nuclear.

La mayor respuesta del sistema de las endotelinas pudo verificarse a la octava semana posterior a la inducción. En este estadio se observó un incremento en la expresión génica del receptor ET_A en ambos segmentos del colon, así como una disminución de la expresión del receptor ET_B en el colon distal. Como ocurre con la marcación de ET-1, el receptor ET_A se localizó principalmente en el citoplasma y en algunos casos, en el núcleo de las células de lesiones precancerígenas y tumorales, así como en linfocitos infiltrantes donde se registró una intensa marcación. Por el contrario, el receptor ET_B predominó en el núcleo de las células cancerosas. En este sentido, se postula que el eje ET-1/ET_A estimularía la maduración de las células dendríticas y en consecuencia la presentación de antígenos a los linfocitos T y la producción de IL-12, lo que a su vez favorecería la respuesta TH1. Por el contrario, el receptor ET_B, actuaría mediando los procesos de inhibición de la adhesión linfocitaria a células endoteliales, por lo que su disminución favorecería los procesos de infiltración tumoral. La ET-1, cuya expresión responde a β-catenina, favorece los procesos de quimioresistencia, proliferación, invasión y metástasis, mediante varios procesos, entre los que se encuentra la acidificación extracelular y alcalinización intracelular vía la activación del intercambiador NHE-1.

En relación con los péptidos natriuréticos, mientras que los niveles de expresión génica de ANP no se modificaron significativamente a lo largo del experimento, a partir de la decimosexta semana posterior a la inducción, los niveles de expresión de CNP mostraron perfiles significativamente superiores a los del colon distal normal, por lo que este péptido podría actuar contrarrestando los efectos y la expresión del sistema de las endotelinas en este segmento.

Summary

Endothelins (ET) are intermediary molecules that play important roles in numerous fundamental physiological and pathophysiological processes. Among these, can be highlighted its participation in cardiovascular disorders, wound healing, lung and kidney diseases, cancerous processes, immunity and even neurotransmission, among others.

However, many of their roles remain still poorly understood. Therefore, in this thesis, were studied and reviewed its roles both in normal colon function as well as in the development of colorectal cancer (CRC). The study was complemented with the natriuretic peptides (NP) ANP and CNP, two natural antagonists of the endothelin system.

In normal colon, ET-1 and ET-2 are differentially expressed in its different regions. ET-1 is the major isoform found in the distal colon, while ET-2 predominates in the proximal segment. The immunolocalization of ET-1 is widespread and exhibits a variable distribution in the different regions studied. This peptide was detected at the cytosol level and sometimes in the nucleus of the colonic epithelial cells, in blood vessel endothelial cells, in muscular cells and in the immune system. Meanwhile, ET-2 has a more restricted localization. This isoform shows, in the proximal colon epithelium, a localization in the lower third of the Lieberkühn crypts, although some signal also occurs in the upper third and in some sections, can be visualized throughout the entire crypt. On the contrary, in the distal colon, its localization occurs exclusively in the lower third of the crypts.

In normal tissues, the main endothelin receptor is ET_B, which is mainly located in the nuclei of mucosal cells, both in the proximal and distal colon, but it could also be detected in lymphocytes and muscle cells. The ET_A receptor exhibits weak levels of gene expression in both segments, although depicts a widespread localization, being the immunolabeling cytosolic, mainly localized at the lower third of Lieberkühn crypts.

In the normal colon, was also demonstrated the natriuretic peptides gene expression. That levels of both NP were similar in both segments and its localization was mainly found in the cytoplasm of the mucosal tissue, in the proximal colon, whereas it was localized in the nuclei of that tissue, in the distal segment.

In summary, the analysis of the results in normal animals revealed that both endothelin and natriuretic peptides exhibit a distribution that allows postulating that they would be involved in maintaining the mechanical properties of the colon crypts. Thus, ET-1 and its receptors are expressed in the subepithelial fibroblasts and its paracrine/autocrine action would contribute to the maintenance of the flat phenotype, which would favor both its cytoplasmic contractility and

tensile properties. Such phenotype is preponderant at the base of the Lieberkühn crypts, whereas towards the apical end, the phenotype is mainly stellate, exhibiting a lower mechanical response to the stresses generated in the colon. Given the ET-2 distribution, in the present thesis it is postulated that this isoform would act reinforcing the ET-1 roles. A similar hypothesis was proposed in the small intestine villi, in which the distribution of ET-2 coincides with the flat phenotype of the fibroblasts.

Another possible role of ET and NP is to act in the water and salts regulation. Thus, the resistance of the colonic epithelium varies in the different segments, increasing towards the distal colon, which allows the reabsorption of water and salts from the feces. In this regard, endothelin is intimately related to the regulation of ionic transporters. In addition, both ET and NP are involved in intestinal motility and in the immune response of the colon to possible insults, a function that is especially increased during the development of CRC.

For the induction of murine colorectal cancer, the carcinogen azoxymethane supplemented with dextran sodium sulphate were used. The analyzes were performed by extracting samples at the fourth, eighth, sixteenth and twentieth weeks, counted from the beginning of the experiment, according to a protocol that has proven to replicate the evolution of pathology [1]. The use of classical histological techniques showed a progression in the formation of tumors from an inflammatory state that favored the development of aberrant crypt foci in the first weeks of induction until the formation of intramucous carcinomas in the last weeks of the experiment. The model was reproduced according to the characteristics reported in the literature. The tumor processes were mainly generated in the distal colon, exhibiting a high degree of infiltration of immune cells and very rarely the formation of an invasive carcinoma was verified. In addition to the qualitative histological analysis, nonlinear optical microscopy techniques were used to analyze the collagen fibers ordering degree in the extracellular matrix. In this study, by means of second harmonic generation microscopy techniques, it was possible to detect and quantify the modifications of this structure from the beginning of the process, which allows postulating this technology as a method for the early detection of the malignant process.

In the experimental context of induced CRC, the endothelin system exhibits remarkable modifications in its expression profiles. One of the most relevant findings is the ET-2 expression remission in the distal colon from the first stage studied (S4), and this situation was reproduced in the proximal colon as the cancerous process spread to that segment (S20). This could be observed at the level of gene expression and peptide synthesis. The abrupt repression of its expression is interpreted as triggering the nullification of the segmentation of the different fibroblastic phenotypes along the stroma that lines the crypts of Lieberkühn. On other hand, regarding to ET-1, this peptide did not exhibit significant modifications in its expression levels

in the early stages (S4-S8), although there was a decrease at the latter ones (S16 and S20). However, in the distal colon, from the first stage, the decrease in ET_B gene expression, a receptor related to ET clearance, could increase the half-life of ET-1, enhancing its effects. The localization of such peptide in the pathological conditions occurs in the cells located in the injured regions (aberrant crypt foci, microadenomas, adenomas and adenocarcinomas) and in the infiltrating lymphocytes, exhibiting mainly cytoplasmic labeling, although in several sections it is also observed nuclear labeling.

It was also of great interest to verify that the greatest response of the endothelin system occurred at the eighth week after induction. At this stage, there was an increase in the ET_A receptor gene expression in both segments of the colon, as well as a decrease in ET_B receptor expression in the distal colon. As occurs with the ET-1 labeling, the ET_A receptor was localized mainly in the cytoplasm and in some cases, in the nucleus of precancerous cells and tumoral lesions, as well as in infiltrating lymphocytes where intense labeling was registered. In contrast, the ET_B receptor signal prevails in the nucleus of cancer cells. In this sense, it is postulated that the ET-1 / ET_A axis would stimulate the maturation of dendritic cells and consequently the presentation of antigens to T lymphocytes and the consequent stimulus to the IL-12 production, which in turn would favor the TH1 response. In contrast, the ET_B receptor would act mediating the processes of inhibition of lymphocyte adhesion to endothelial cells, so that its decrease would favor the processes of tumor infiltration. ET-1, whose expression responds to β -catenin, favors the processes of chemoresistance, proliferation, invasion and metastasis, through several processes, including extracellular acidification and intracellular alkalinization via the activation of the NHE-1 exchanger.

Regarding natriuretic peptides, whereas the levels of ANP gene expression were not significantly modified throughout the experiment, from the sixteenth week after induction, the CNP expression levels showed profiles significantly higher than those of normal distal colon, so this peptide could act counteracting the effects and expression of the endothelin system in this segment.

1. Introducción

La superficie del epitelio gastrointestinal es la mayor mucosa continua de los mamíferos. Adicionalmente a su papel en la digestión y la absorción de nutrientes, el epitelio intestinal es también una barrera de exclusión, que separa el mundo microbiano que puebla el lumen intestinal, del ambiente aséptico del intersticio. Estas dos funciones de filtro y bloqueo respectivamente, se llevan a cabo por una capa simple de células epiteliales.

Mientras que los epitelios estomacal e intestinal delgado se caracterizan por una arquitectura de cripta-vello, en el intestino grueso las vellosidades desaparecen dando lugar a un epitelio tapizado de criptas de Lieberkühn. En general, las criptas están involucradas en la renovación celular, la secreción de mucosidad y la absorción de iones y agua, mientras que las funciones del epitelio vellosito están relacionadas con la absorción de nutrientes. En la base de las criptas de Lieberkühn existen células multipotentes que originan una serie de células progenitoras, que subsecuentemente experimentan procesos de diferenciación que conducen al establecimiento de los tipos celulares característicos de cada región. Las células diferenciadas migran a lo largo de los ejes de cada cripta experimentando, una vez que sufren daños irreversibles, procesos de muerte celular programada (apoptosis) y posterior liberación al lumen intestinal.

El epitelio intestinal está sometido constantemente al acoso microbiano. Éstos juegan un rol fundamental en el metabolismo y es, en su mayor parte, considerada benéfica (si no esencial) para la salud. Sin embargo, algunas de las especies bacterianas que cohabitan el lumen intestinal son patógenos oportunistas y son capaces de causar enfermedades si acceden al compartimiento sistémico. Es por estas razones que el epitelio intestinal posee varias barreras innatas para evitar la unión y colonización microbiana en las superficies mucosas y está altamente coordinado tanto con el sistema inmunológico innato como con el adaptable. Adicionalmente, el epitelio intestinal juega un papel importante en la regulación, mantenimiento y control de las funciones cardiocirculatorias a través de la producción y liberación de múltiples sustancias. Tiene acción antitrombogénica y su intervención es fundamental en la regulación vasomotora.

El cáncer colorrectal (CCR) incluye diversos tipos de neoplasias de colon, recto y apéndice. Esta patología se origina cuando células normales del revestimiento interno del colon o del recto sufren mutaciones y crecen sin control, formando una masa denominada tumor. Éste puede ser benigno o maligno, lo cual significa que puede diseminarse a otras partes del cuerpo. El desarrollo de estos cambios suele demorar mucho y éstos pueden ser consecuencia de factores genéticos, epigenéticos y/o ambientales. En la Argentina, en 2012, el registro del Instituto Nacional del Cáncer, informó que el CCR constituye la tercera causa de mortalidad por cáncer, en mujeres después de los de mama y de cuello uterino, mientras que en hombres se ubica detrás del cáncer de próstata y el de pulmón [2].

Las endotelinas son hormonas peptídicas con funciones pleiotrópicas, que se ha postulado están involucradas en el desarrollo del CCR [3]. Se cree que la endotelina 1 (ET-1) participa en el crecimiento y la progresión de una variedad de tumores tales como los de próstata, ovario, riñón, pulmón, colorrectal, de cuello uterino, de mama, de vejiga, carcinomas endometriales, tumores cerebrales, sarcoma de Kaposi, melanoma y metástasis óseas [4]. El presente trabajo, se enfocó particularmente en el sistema de las endotelinas y su rol en condiciones fisiológicas y patofisiológicas del colon y el recto murino. En los estudios iniciales de esta familia de hormonas, dada su alta homología y a que ambos péptidos presentan similar afinidad por sus receptores, se hipotetizó que endotelina 2 (ET-2) cumpliría funciones similares a las de la ET-1. Debido a esta asunción, el estudio de las endotelinas se centró históricamente en la investigación de la ET-1, siendo la isoforma ET-2 mucho menos explorada. Investigaciones recientes sugieren que nuestra comprensión de la familia de las endotelinas requiere una reevaluación de esta última. Actualmente, han surgido evidencias que permiten indicar que la ET-2 tendría un papel clave tanto en la fisiología intestinal, como en la ovárica, en la insuficiencia cardíaca, en inmunología y en el cáncer.

Otra familia de péptidos vasoactivos que recientemente han comenzado a cobrar interés en relación con el cáncer, son los denominados péptidos natriuréticos, hormonas con funciones natriuréticas, diuréticas y antimitogénicas. De esta familia de péptidos, cuatro de ellos han sido recientemente implicados directamente en la reducción de la tasa de crecimiento de células cancerosas *in vitro*, ellos son: el péptido natriurético atrial, el dilatador vascular, el péptido kaliurético y el péptido natriurético de acción prolongada [5]–[7]. Dichos péptidos también se expresan en el sistema digestivo y su relación con el sistema de las endotelinas ha sido pobremente estudiada. Dada la función clásicamente antagónica de estos péptidos con el sistema de las endotelinas, en la presente tesis se ha analizado su expresión en los modelos experimentales de cáncer colorrectal, con el objetivo de aportar nuevos datos que permitan profundizar la comprensión y dilucidación de los roles de las endotelinas y sus receptores, así como los péptidos natriuréticos en colon murino normal y patológico.

1.1 Biología general del sistema de Endotelinas

1.1.1 Generalidades de los ligandos

Las endotelinas (ET) constituyen una familia de moléculas de la que al presente se han descripto tres isoformas estrechamente relacionadas: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) y endotelina 3 (ET-3) [8]. Estos péptidos poseen 21 residuos de aminoácidos, cuatro de los cuales son cisteínas (Cys), responsables del establecimiento de un par de puentes disulfuro intramoleculares, que le dan una estructura semicónica. ET-2 y ET-3 difieren de ET-1 en dos y

seis residuos de aminoácidos respectivamente. Los puentes disulfuro y el dominio carboxilo terminal son críticos, tanto para la unión de las endotelinas con su receptor específico como para su actividad biológica [9]. Los efectos de estos ligandos son mediados por al menos dos subtipos de receptores que pertenecen a la súperfamilia de receptores acoplados a proteína G, el receptor para endotelinas tipo A (ET_A) y el receptor para endotelinas tipo B (ET_B).

La ET-1 es la isoforma más abundante en el sistema cardiovascular humano y se expresa ampliamente, por ejemplo, en las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos [10]. El péptido se libera de forma continua, interactuando predominantemente con los receptores ET_A presentes en los músculos lisos vasculares, causando vasoconstricción y contribuyendo al mantenimiento del tono vascular fisiológico normal en humanos y ratones [11], [12]. La ET-3 es la principal isoforma del cerebro de rata [13]. Se encuentra principalmente restringida a las neuronas y células gliales, siendo particularmente abundante en el neocórtex, en los núcleos hipotalámicos, en el hipocampo, en las células de Purkinje del cerebelo y en la médula oblonga [14]. La expresión de ET-2 es más restringida y tiene una distribución específica de órganos. Fue detectada en corazón, pulmón, ovario, estómago e intestino [15]. En todas las regiones del intestino, se han detectado niveles particularmente elevados de ET-2 (duodeno, yeyuno, íleon, colon y recto) y en ovario [16], [17].

En 1989 fue descubierto un péptido homólogo de ET-2 en ratón [18]. El mismo difiere en un aminoácido de la ET-2 humana y se lo denominó péptido Vasoactivo de Contracción Intestinal (VIC) (Figura 1). Así, en esta especie las ET son identificadas como: ET-1, VIC y ET-3; completándose el sistema con los receptores para endotelina tipo A (ET_A) y tipo B (ET_B).

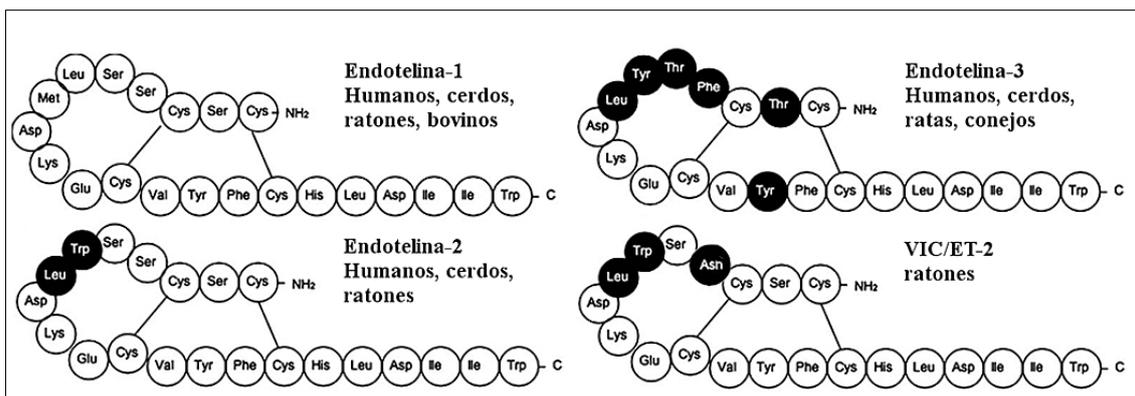


Figura 1. Isopéptidos de endotelinas en distintas especies. Se resaltan los aminoácidos que presentan variaciones entre las isoformas.

1.1.2 Genes de Endotelinas

La secuencia codificante de cada isopéptido está altamente conservada en los mamíferos y está estrechamente relacionada con las sarafotoxinas del veneno de ofidios. En humanos, cada uno

de los péptidos (ET-1, ET-2, ET-3) es codificado por genes independientes ubicados en los cromosomas 6, 1 y 20 respectivamente [8], mientras que en ratones estos genes se localizan en los cromosomas 13, 4 y 2, respectivamente [19]. Las secuencias transcritas no sufren corte y empalme (*splicing*) alternativo, aunque la secuencia del gen exhibe variaciones interespecíficas [20]. Las tres isoformas son sintetizadas como preprohormonas y posteriormente procesadas a péptidos activos.

Los datos de la secuencia del gen de VIC/ET-2 están depositados en la librería EMBL/GenBank/DDBJ con número de entrada AB030303. Dicha secuencia posee una longitud total de 7.411 pares de bases (pb). En la figura 2 se observa que de ésta, el gen prepro-VIC/ET-2 de ratón es codificado por 5 exones, con 4 intrones intercalados (comprendiendo, desde la primera base del primer exón hasta la última base del quinto exón, un total de 5.912 pb del ADN genómico). En el gen del prepro-VIC/ET-2, un 21% comprende su secuencia exónica y un 79% a la intrónica. Todos los sitios de empalme donante/aceptor en la secuencia de nucleótidos que flanquean los extremos de los exones, están constituidos según la regla GT/AG [21]. Este análisis, permite comprender la secuencia de eventos que conducen a la biosíntesis del péptido VIC/ET-2 bioactivo, la cual se grafica en la figura 2 y se detalla a continuación.

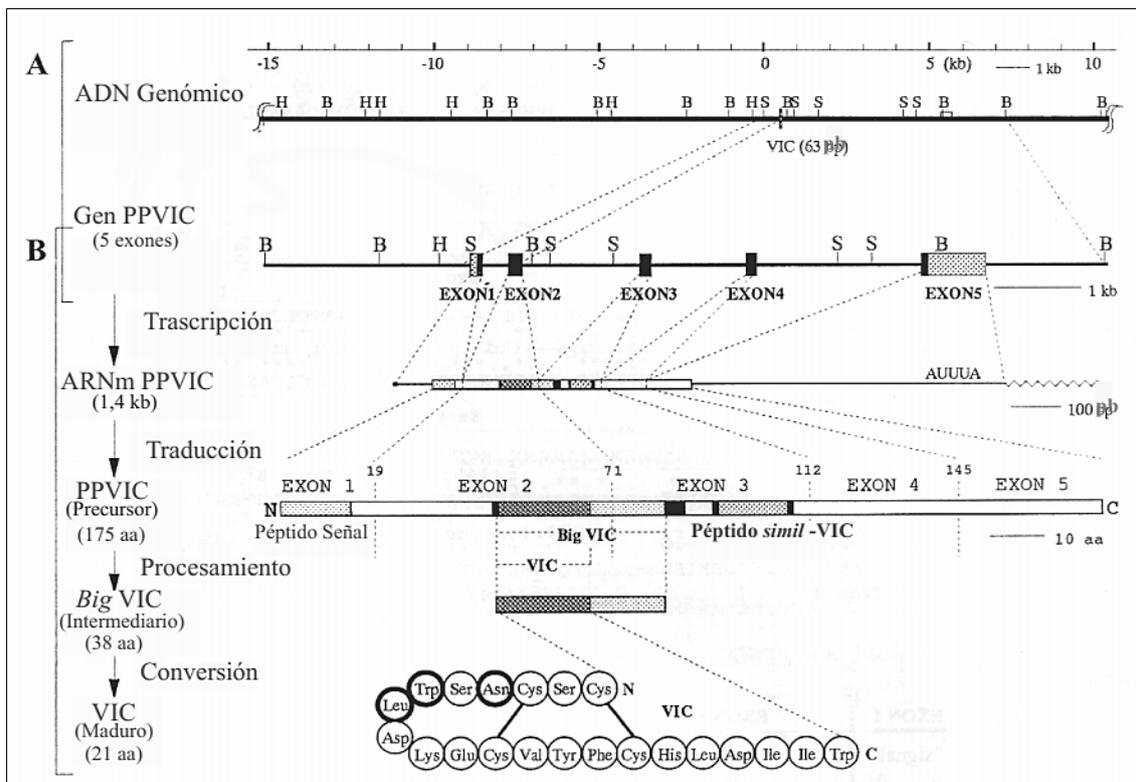


Figura 2. Análisis de la secuencia y estructura del gen prepro-VIC/ET-2 de ratón. A la derecha se muestra la organización genómica. La porción secuenciada del gen PPVIC/ET-2 y la porción de los 63 pb del VIC/ET-2 están conectadas por líneas de puntos a las correspondientes regiones del ADN genómico clonado. Las regiones codificantes están señaladas por recuadros negros; las regiones 5' y 3' no traducibles se señalan con recuadros punteados y las secuencias laterales 5' y 3' se indican mediante

líneas. Los sitios de restricción son los siguientes: B, BamHI; S, SacI; H, HindIII. A la izquierda se representa de forma esquemática el camino de biosíntesis desde el gen hasta el péptido VIC/ET-2 maduro; (Figura modificada de Saida y col, 2000).

1.1.3 Ruta biosintética

La vía metabólica para la activación biológica es similar en los tres isopéptidos, por lo que, en el presente trabajo nos enfocaremos principalmente en la ET-2. El primer producto de la transcripción del gen EDN2 es la preproendotelina-2, de 175 aminoácidos.

Después del clivaje de la secuencia señal, la proendotelina resultante es escindida por la furina, una convertasa de la vía secretora, produciendo un péptido de 37 aminoácidos, la *big* ET-2. Actualmente, se sabe que el procesamiento de la ET-1 se lleva a cabo a partir de la *big* ET-1 por una hidrólisis inusual del enlace peptídico Trp21-Val22, en lugar de las más frecuentes Arg-Arg o Arg-Lys que se da en otros prepropéptidos [22]. Dicha síntesis es catalizada por una metaloproteasa unida a la membrana, la enzima de conversión de endotelina 1 (ECE-1). La ET-1 también es procesada por ECE-2, una segunda metaloproteasa que tiene un 59% de homología con la ECE-1 bovina, pero que tiene una actividad óptima para la escisión de la *big* ET-1 a pH ácido, en comparación con el rango neutral en el que actúa ECE-1 [23]. La ECE-2 también escinde otros péptidos, incluyendo el vasodilatador bradiquinina. Existen al menos cuatro isoformas de ambas enzimas que difieren en su distribución celular y tisular, lo que posiblemente esté relacionado con una actividad funcional diferencial. En la literatura, existen grandes controversias acerca de la eficiencia de las ECE en la conversión *in vitro* de la *big* ET-2, comparado con los estudios *in vivo*. Aunque la *big* ET-2 y la *big* ET-1 comparten el mismo enlace escindible (Trp21-Val22), la tasa de conversión de la primera por ECE-1 y ECE-2 es menor al 10 % en comparación con la de la *big* ET-1 en el mismo ensayo [23]. La razón de esta disminución en la eficiencia de las enzimas de conversión en el procesamiento de la *big* ET-2 puede deberse a que ésta difiere en los residuos 27-29, los que son cruciales para la eficiencia de las enzimas ECE-1 y ECE-2 [24]. La *big* ET-2 provoca la contracción de bronquios humanos aislados, dicho efecto es comparable con el ejercido por *big* ET-1 y con una respuesta máxima equivalente a la de la ET-2, lo que demuestra la conversión completa de éste péptido precursor [25]. Los autores sugirieron que la actividad de las ECE en los bronquios humanos tiene igual especificidad para ambos precursores, o que existen múltiples enzimas dentro de este tejido y que al menos una de ellas posee una alta especificidad para la conversión de la *big* ET-2.

Con respecto al transporte y liberación de las ET, al presente sólo se ha reportado un estudio en el que, utilizando inmunocitoquímica a nivel ultraestructural, se logró detectar la presencia de vesículas de secreción y cuerpos de Weibel-Palade (gránulos de almacenamiento específico de células endoteliales) de ET-1 [26]. En este estudio, se propusieron dos vías de liberación del péptido, una vía secretora constitutiva (en la que el péptido sintetizado es continuamente

transportado y secretado) y una regulada (en la cual, el péptido puede ser almacenado en cuerpos de Weibel-Palade y posteriormente liberado frente a un estímulo apropiado) [26].

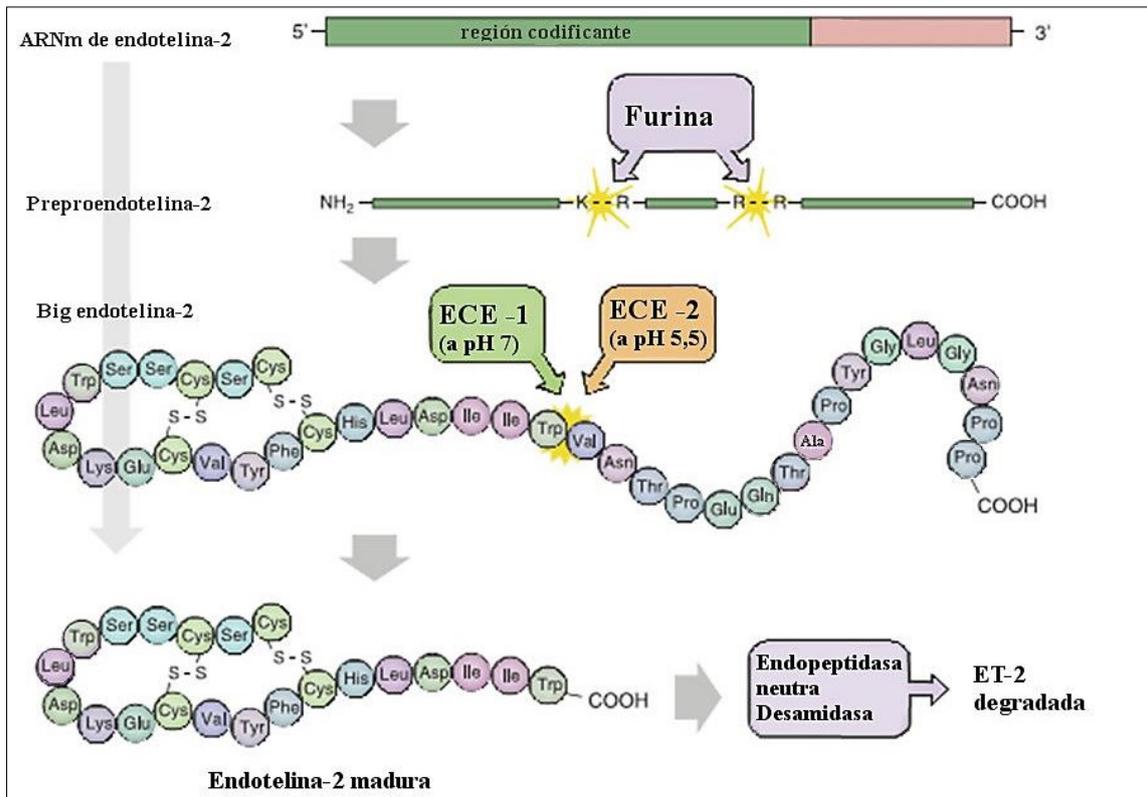


Figura 3. Esquemización de las etapas de la biosíntesis, el procesamiento y el catabolismo de ET-2; (Figura modificada de Kohan y col., 2011).

1.1.4 Catabolismo

En general, las ET pueden ser degradadas, al menos en parte, por la endopeptidasa neutra [27]. La desamidasa (también denominada proteína protectora lisosómica) es otra enzima que se ha postulado que actúa en la proteólisis de las ET [28], [29]. Esta enzima tiene una actividad óptima en medio ácido, en contraste con el pH neutro óptimo, de la endopeptidasa. Ambas enzimas están ampliamente distribuidas en todo el organismo. Aunque la ET-1 probablemente pueda ser catabolizada en la mayoría, si no todos los órganos, el riñón parece ser particularmente importante en dicho proceso ya que la ET-1 provoca aumentos sostenidos de la presión sanguínea en ratas bilateralmente nefrectomizadas [30] y que la ET-1 circulante, no es detectada en la orina [31].

1.1.5 Biología molecular de los receptores

En los mamíferos, los receptores de endotelinas se originan a partir de dos genes independientes. Éstos están presentes como copias simples en el genoma de diferentes especies, como bovinos, porcinos, murinos y humanos [32]–[35]. Tanto en humanos como en ratones, el receptor ET_A posee 427 residuos de aminoácidos, en humanos su gen se encuentra localizado en

el cromosoma 4 mientras que en ratones, en el cromosoma 8. Éste presenta alta afinidad tanto por ET-1 como por ET-2 y mucho menor por la ET-3 [34]. Recientemente se han identificado variantes de este receptor debidas al *splicing* alternativo en la glándula pituitaria de rata [36]. Una de esas variantes, ha mostrado actuar reduciendo la movilización de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y estimular la actividad de la adenilatociclasa. Sin embargo, aún no está claro si en otro tejido se produce ésta, u otra variante de *splicing*, así como tampoco se ha reportado si juega roles fisiológicos significativos para el organismo. El receptor ET_B tanto en humanos como en ratones contiene 442 residuos de aminoácidos. En humanos, su gen está localizado en el cromosoma 13, mientras que en ratones se ubica en el 14. Este receptor exhibe prácticamente la misma constante de afinidad para todas las endotelinas [37], [38]. Una variante de este receptor, generada por *splicing* alternativo y que contiene diez residuos de aminoácidos adicionales, ha sido descrita en humanos [39]. Sin embargo, esta variante no ha sido identificada en otras especies y no presenta diferencias aparentes en la señal celular evocada [20]. Otra variante del receptor ET_B humano, difiere marcadamente en el dominio citoplasmático y en la región 3' no traducible [40]. Esta variante muestra actividad de señalización mínima, por lo que se la considera un receptor de depuración. En ratas, también ha sido descrita una variante de ET_B , aunque su rol no ha sido evaluado [33]. Tanto para las variantes de *splicing* de ET_A como para las de ET_B , aún resta determinar tanto la distribución celular como su significado fisiológico. Sumado a esta variedad de tipos de *splicing*, en rata se ha demostrado la glicosilación de los receptores de las ET, aunque no se ha identificado la implicancia funcional de la misma [41]. Finalmente, ha sido identificado un tercer receptor de endotelinas en *Xenopus leavis*, el mismo presenta una mayor afinidad por ET-3 que por ET-1 y ET-2 [42], pero éste no ha sido hallado en mamíferos [43].

1.1.6 Localización y señalización

Los receptores ET_A y ET_B pueden expresarse individualmente uno u otro, o en combinaciones de los dos tipos, por distintos tipos celulares. La expresión de ET_A es particularmente abundante en el músculo liso vascular y los miocitos, mientras que ET_B es el principal receptor de las ET que se encuentra en las células endoteliales y los túbulos renales. Los receptores de las ET activan una serie de sistemas que varían dependiendo del tipo de señalización celular. Estos receptores están acoplados a varios miembros de la familia de las proteínas G, como las G_i , G_q , G_s y $G_{\alpha 12/13}$ [44]–[46] regulando una variedad de cascadas de señalización que incluyen adenilatociclasas, ciclooxygenasas (COX), citocromo P-450, sintetasa de óxido nítrico (NOS), proteína nuclear P8 [47], serina/treonina quinasas, tirosina quinasas, entre otras [48]. Los receptores ET_A y ET_B a menudo ejercen acciones antagónicas, por ejemplo, en los vasos sanguíneos la activación de ET_A provoca vasoconstricción, mientras que la activación de ET_B , al

menos inicialmente, promueve vasodilatación. Adicionalmente, la estimulación de ET_A incrementa las tasas de proliferación celular y la fibrosis, mientras que el ET_B típicamente tiene efectos opuestos. Sin embargo, existen varias excepciones en las que ET_A y ET_B pueden provocar respuestas biológicas similares.

Existe además, cierta incertidumbre sobre la función de las isoformas individuales de los receptores de las ET. Parte de este problema puede deberse a la dimerización de los mismos [49]. La expresión heteróloga de receptores de las ET reveló la presencia de homodímeros ET_A y ET_B [50]. Un hecho de mayor impacto biológico lo constituye la evidencia de la ocurrencia de heterodimerizaciones ET_A/ET_B, basadas en las diferencias en la internalización dependiente de ligandos del receptor [51]. Usando células HEK293, Evans y Walker encontraron que la heterodimerización de ET_A y ET_B se lleva a cabo a partir de dominios PDZ. Así, se encontró que las mutaciones del dominio PDZ causan el retraso en la internalización del receptor y un aumento prolongado en el [Ca²⁺]_i en respuesta a ET-1, lo que sugiere que la heterodimerización ET_A/ET_B afecta la función del receptor [52]. Además de su capacidad de dimerizar con ET_A, ET_B podría hacerlo con otros receptores, entre ellos el receptor D3 de dopamina y el AT1 de angiotensina II (ANG II) [53], [54] (Figura 4). Sin embargo, no existen evidencias definitivas para asignar un papel fisiológico a estos heterodímeros y tampoco se los ha podido identificar *in vivo*. La dilucidación de esta incógnita no sólo tiene una obvia relevancia biológica, sino que además es sumamente importante en la interpretación de los estudios que utilizan agonistas o antagonistas supuestamente específicos de isoforma.

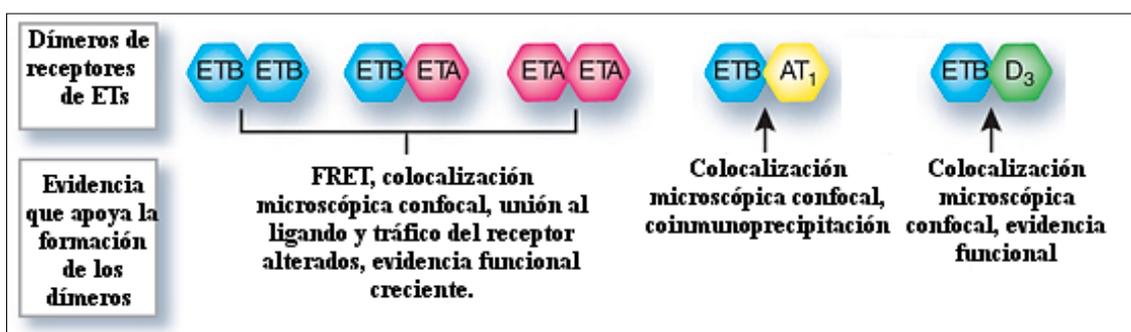


Figura 4. Posibles homo y heterodímeros de los receptores de ET. Debajo de las posibles combinaciones, se indican las técnicas mediante las cuales se ha revelado su formación; (Figura modificada de Boesen, 2008).

1.1.7 Regulación de las Endotelinas

La regulación del gen de ET-1, EDN1, ha sido revisada en detalle [55]. La complejidad de su regulación es indicativa del importante papel de las ET en la homeostasis del colon. La mayoría de los estudios sugieren que la regulación de ET-1 tiene lugar a nivel transcripcional, ya que varios factores como la hipoxia, la ingesta de algunas bebidas alcohólicas y la leptina, promueven la mediación de factores de transcripción que interactúan con elementos *cis* en las

regiones promotoras de EDN1 [56]–[60]. Sin embargo, las modificaciones postranscripcionales, la regulación epigenética y por micro-ARN, también podrían explicar la modulación tisular diferencial específica de la expresión de ET-1 [61]–[63]. Por el contrario, se sabe muy poco acerca de EDN2, excepto que en humanos está mapeado en el cromosoma 1 p34 [64]. Aunque la evidencia es escasa e incompleta, hay distintos mecanismos que regulan la producción de ET-2. Por ejemplo, se ha demostrado, un efecto inhibitorio del factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre la producción de ET-2, pero no sobre la de ET-1 en células adenocarcinomas renales [65]. Lambert y colaboradores exploraron compuestos que regulan la expresión de ET-2 y la secreción del péptido en líneas celulares humanas de adenocarcinomas renales [66], [67]. Se ha probado que tanto TNF- α como forskolina y dibutilil AMPc (análogo del AMPc permeable a la célula) estimulan aumentos dependientes de la dosis, en la síntesis de los transcritos de ET-2, así como la liberación del péptido. Asimismo, se ha demostrado que varios factores tales como la hipoxia y la progesterona pueden afectar la expresión de ET-2, sin embargo, su control transcripcional y la conversión al péptido maduro que subyace a la intervención de estos factores, está muy lejos de ser clarificada [24].

1.1.8 Funciones de las ET

Las ET afectan prácticamente a todos los sistemas de regulación de la presión sanguínea y la homeostasis del sodio. En general, la activación del receptor ET_B provoca la reducción de la presión sanguínea y promueve la excreción urinaria de Na⁺. Dichos efectos son debidos a combinaciones de acciones entre las que se pueden destacar, la vasodilatación mediada por la estimulación de la producción de NO por las células endoteliales, la inhibición del transporte de Na⁺ en la rama ascendente gruesa del túbulo proximal y en el conducto colector; la reducción de la reabsorción de agua en este último; la inhibición de la liberación de catecolaminas adrenales que responden al estímulo neural; la inhibición de la liberación de renina y el posible inotropismo negativo. Además, la administración intravenosa de agonistas selectivos de ET_B, típicamente reduce la presión sanguínea y aumenta el volumen de orina, mientras que los roedores con deficiencias en ET_B son hipertensos.

En contraste, ET_A generalmente aumenta la presión sanguínea ya que la activación de este receptor provoca vasoconstricción, aumento de la liberación de catecolaminas adrenales por estímulo nervioso e inotropismo positivo. La administración de antagonistas selectivos de ET_A normalmente reduce la presión arterial. Sin embargo, este simple paradigma no se sostiene para todos los sistemas de órganos. Por último, tanto ET_A como ET_B están involucrados en el control neurológico de la presión sanguínea, aunque sus efectos precisos aún no se han dilucidado. En esencia, el sistema de endotelinas debe ser visto como un sistema autocrino y paracrino; la

comprensión de cómo las endotelinas regulan la presión sanguínea y la homeostasis del Na^+ sólo se logrará mediante el examen de este sistema en el contexto del entorno local [20].

1.2 Familia de los péptidos natriuréticos

La familia de péptidos natriuréticos comprende el péptido natriurético auricular (ANP), [163], el péptido natriurético cerebral (BNP) [164] y el péptido natriurético tipo C (CNP) [165]. Al presente, se reconocen tres receptores de estas moléculas, los receptores tipo A (NPR-A), tipo B (NPR-B), y tipo C (NPR-C). El primero se une con mayor afinidad a ANP y BNP, mientras que CNP lo hace preferencialmente a NPR-B [166]–[168]. El NPR-C se cree que es el receptor de depuración [166], [168]. Como ocurre con las endotelinas, los tres ligandos son codificados por tres genes independientes, a partir de los cuales se sintetizan tres prohormonas diferentes: el propéptido natriurético atrial (pro-ANP) de 126 aminoácidos, el propéptido natriurético cerebral (pro-BNP) de 108 aminoácidos y el propéptido natriurético tipo C (pro-CNP) de 126 aminoácidos. El procesamiento de éstos genera múltiples péptidos con propiedades vasodilatadoras, natriuréticas, diuréticas y/o kaliuréticas, tanto en animales [169], [170] como en humanos [171], [172]. Por ejemplo, del procesamiento del pro-ANP, se generan, un péptido de 30 residuos de aminoácidos a partir del extremo N-terminal conocido como LANH (hormona natriurética de acción prolongada), una segunda molécula que incluye los residuos de aminoácidos desde el 31 al 67, que se conoce como dilatadora de vasos, la hormona kaliurética que incluye los aminoácidos del 79 al 98 y finalmente el ANP a partir del extremo C-terminal, desde el aminoácido 99 al 126.

En el mantenimiento de la volemia, a diferencia de las endotelinas, los péptidos natriuréticos poseen actividad antihipertensiva y reducen el volumen plasmático [173]. Otra acción de los péptidos natriuréticos es la reducción del tono simpático en los vasos periféricos (vasoconstricción). El CNP actúa como regulador del tono vascular (vasorelajante) e inhibidor del crecimiento del músculo liso vascular, con una actividad principalmente parácrina, contribuyendo con la regulación del flujo coronario [174]. Al nivel renal, los PN estimulan la natriuresis y diuresis. Tanto el ANP como el BNP ejercen efectos diuréticos sobre el riñón a nivel glomerular y natriuréticos a nivel del tubo colector. El ANP posee actividad antimitogénica tanto en el sistema cardiovascular como en otros sistemas [175], [176]. Tanto ANP como CNP inhiben la mitogénesis en cultivos de células vasculares y en arterias coronarias, principalmente a través de mecanismos dependientes de GMPc y del receptor RPN-A [177], [178]. Esto implica que los PN actuarían modulando el crecimiento de la pared vascular en patologías como aterosclerosis, hipertensión o restenosis postangioplastia [179]. También se ha probado que *in vitro*, ANP y BNP inhiben el crecimiento de fibroblastos cardíacos, retardando el depósito de colágeno y el remodelado proliferativo del corazón [180];

mientras que el ANP puede también inducir apoptosis de los cardiomiocitos. Así, a través de estas acciones directas e indirectas los PN limitan potencialmente la proliferación miocárdica o la hipertrofia al daño por isquemia, regulando localmente el remodelado ventricular [181].

1.3 Tracto gastrointestinal normal

1.3.1 Anatomía general del tracto gastrointestinal en mamíferos

El tracto gastrointestinal se extiende desde la boca hasta el ano y consta de cuatro regiones anatómicas principales: el esófago, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso o colon. La pared del tracto gastrointestinal es esencialmente similar en estructura a lo largo de su longitud, conteniendo cuatro capas histológicas principales a saber:

1. La serosa, formada por una capa fina de tejido conectivo y un mesotelio (epitelio plano simple) que reviste la cavidad peritoneal.
2. La muscular, formada generalmente por dos estratos de células musculares lisas:
 - La capa circular interna
 - La capa longitudinal externa

Entre éstos dos estratos de células musculares lisas se encuentra el plexo mientérico (o de Auerbach) que regula la contracción de las células de la muscular externa (peristaltismo).

3. La submucosa, formada por tejido conectivo denso irregular con abundantes vasos sanguíneos y linfáticos. En esta capa se encuentra una red de fibras nerviosas vegetativas (simpáticas y parasimpáticas) y neuronas parasimpáticas que forman el plexo submucoso (o de Meissner) y que inerva los vasos y las fibras musculares lisas de la muscular de la mucosa.
4. La mucosa, establece una barrera de protección (el epitelio) entre el medio externo (el lumen del tubo) y el resto de los tejidos. Adicionalmente, la mucosa del tubo digestivo cumple con las funciones de absorción de los nutrientes, resultantes de la digestión y de secreción de productos (enzimas digestivas, mucus, hormonas, etc.). Éste compartimiento está formado por los siguientes tejidos:
 - Epitelio de revestimiento: el cuál exhibe marcadas diferencias en los diversos segmentos del tubo digestivo.
 - Lámina propia: formada por tejido conectivo laxo infiltrado con acúmulos de tejido linfoide, irrigada por una profusa red de vasos sanguíneos.

- Muscular de la mucosa: formada por células musculares lisas que se disponen en dirección circular en la parte interna y longitudinalmente, en la parte externa.

La mayoría de las diferencias estructurales de la pared de los diversos segmentos del tubo digestivo se verifican en la mucosa.

1.3.2 Anatomía e histología del Intestino grueso de mamíferos

El intestino grueso es la porción final del tubo digestivo y comprende varios segmentos, entre ellos el ciego, al que se une el apéndice vermiforme, el colon (con sus porciones ascendente, transversal, descendente y sigmoide) y el recto que finaliza en el conducto anal.

El intestino grueso cumple con dos funciones principales, la reabsorción de agua y electrolitos y el transporte y eliminación de las heces. Para facilitar el tránsito de éstas y proteger la superficie intestinal, las células caliciformes secretan una gran cantidad de mucus. Aunque anatómicamente las diversas partes del intestino grueso están bien definidas, su estructura histológica es muy similar.

La capa mucosa que limita el lumen está recubierta por un epitelio cilíndrico simple de revestimiento en el que se distinguen distintos tipos celulares:

- Los enterocitos: células absortivas columnares cuya principal función es la reabsorción de agua y electrolitos. La morfología de las mismas es idéntica a la de los enterocitos del intestino delgado. La reabsorción se da mediante bombas de sodio potasio (Na^+/K^+ -ATPasas), localizadas en la membrana plasmática lateral. Éstas reducen transitoriamente la concentración citoplasmática de Na^+ por transporte a través de la membrana plasmática lateral al espacio extracelular, debajo de la unión estrecha. Esta transferencia crea una alta concentración de Na^+ intercelular haciendo que el agua que ingresa a la célula, sea enviada al espacio intercelular, reduciendo tanto el agua como las concentraciones de Na^+ . Por consiguiente, mientras se mantenga la funcionalidad de la bomba de sodio, se mantiene el ingreso de agua y Na^+ a través de la superficie apical, pasando a través de la misma, y saliendo por la membrana plasmática lateral. El aumento de la osmolaridad en el espacio intercelular promueve el pasaje de agua hacia este espacio, estableciendo una presión hidrostática que impulsa el Na^+ y el agua a través de la lámina basal hacia el tejido conectivo.
- Las células caliciformes: son glándulas unicelulares secretoras de mucus. Dicha actividad es continua, incluso una vez que han alcanzado la superficie luminal.
- Las células endocrinas: forman parte del sistema endocrino difuso, se localizan entre los enterocitos y las células caliciformes. Estructuralmente son similares a las células

endocrinas del estómago y son responsables de la síntesis de diversos tipos de hormonas.

- Las células M: son células epiteliales que se localizan sobre las placas de Peyer o nódulos linfoides grandes. En su superficie apical exhiben micropliegues, que tienen como función la captura de microorganismos y macromoléculas que son endocitadas y transportados (transcelularmente) hasta el espacio intercelular del epitelio en el que se ponen en contacto con linfocitos residentes en ese compartimiento, actuando como presentadoras de antígenos.
- Los linfocitos: que pueden encontrarse dispersos entre las células epiteliales de revestimiento. En condiciones normales son escasos, pero su número se incrementa en situaciones patológicas.

En la mucosa del intestino grueso no hay válvulas conniventes ni vellosidades intestinales. Mediante microscopía electrónica de barrido se pueden visualizar, distribuidos por toda la superficie de la mucosa, los orificios en los que desembocan las criptas de Lieberkühn.

En las criptas, las células con capacidad absorptiva son relativamente escasas y se encuentran intercaladas con las células caliciformes, más abundantes. Al igual que en el intestino delgado, las células progenitoras se localizan en la base de la cripta y son las responsables de la renovación epitelial del intestino grueso, un proceso muy dinámico que se da en unos pocos días. Las criptas del intestino grueso carecen de células de Paneth, aunque se pueden encontrar células endocrinas en la base de las criptas.

Por debajo de la lámina basal del epitelio, se encuentra la lámina propia, ésta contiene fibras colágenas y una vaina de fibroblastos que rodea las criptas de Lieberkühn (fibroblastos pericriptales). La lámina propia alberga gran cantidad de células del sistema inmunitario como macrófagos, células plasmáticas, linfocitos, mastocitos y granulocitos. Esta estructura está ricamente irrigada por vasos sanguíneos y contiene numerosas fibras nerviosas. Carece de vasos linfáticos ya que éstos se ubican principalmente en la submucosa. La muscular de la mucosa está formada por dos finas capas de fibras musculares lisas, la circular interna y la longitudinal externa. La capa submucosa, la capa muscular externa y la serosa guardan estrechas similitudes con las observadas en el resto del tubo digestivo.

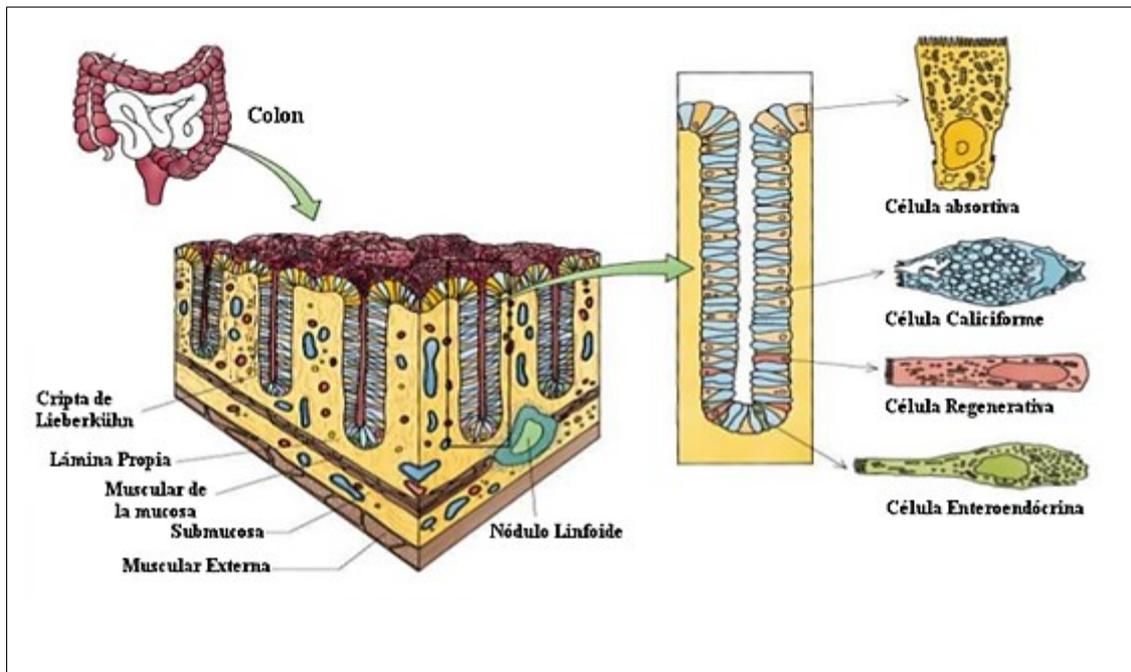


Figura 5. Representación esquemática de la histología del colon normal de mamíferos; (Figura modificada de Gartner y col., 2013 [68]).

1.4 Endotelinas en el tracto gastrointestinal

En los mamíferos utilizados como modelos experimentales y en humanos, se ha demostrado que el sistema de las endotelinas está presente en el tracto gastrointestinal [13], [16], [69], aunque no se han clarificado totalmente sus funciones. En estómago, duodeno, yeyuno, íleon, colon y recto de ratones normales se han discriminado los niveles de expresión de los transcritos de VIC/ET-2, en comparación con los de ET-1 [70]. En este trabajo, también se estudió la expresión génica de los receptores ET_A y ET_B en cada órgano. Dada la singular abundancia intestinal de los transcritos para VIC/ET-2, se realizó un estudio combinando técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia para determinar la localización celular-tisular de los péptidos en este órgano [71]. En los distintos segmentos, se verificaron diferencias regionales significativas en la expresión del sistema, sugiriendo la existencia de mecanismos de regulación en los procesos de traducción de dichos mensajeros [17], [70]. Adicionalmente a las funciones de contracción-relajación, y en función de la particular distribución de los péptidos y sus receptores en intestino, se hipotetizo sobre la existencia de un mecanismo de acción diferencial de VIC/ET-2 y ET-1 [70], [71].

En el estómago, se ha postulado que ET-1 ejercería una potente acción ulcerogénica y vasoconstrictora [72]. Adicionalmente, se ha reportado la expresión esofágica de ET-1 y se ha sugerido que su sobreexpresión y la del receptor ET_A , podría estar relacionada con la progresión de los procesos inflamatorios que conducen al desarrollo de la condición esofágica precancerosa conocida como esófago de Barrett [73].

1.5 Antecedentes del sistema de las endotelinas en el colon

Al presente se han publicado escasos trabajos en relación con la distribución y el rol de las ET colónicas. Entre los estudios pioneros se destacan los de Inagaki y colaboradores, quienes mediante técnicas de inmunohistoquímica y autoradiografía *in vitro* demostraron inmunorreactividad y sitios de unión para la ET-1 en el sistema nervioso entérico humano [74]. Estos péptidos se localizan en los haces nerviosos y la mayoría de las células ganglionares de los plexos mientérico y submucoso. Este estudio proporcionó evidencias de que ET-1 actúa como un neuropéptido en el colon humano con sitios de unión en plexos neurales y mucosa, lo que les permitió postular un posible papel en la modulación de la motilidad y la secreción en el intestino humano, aunque también se ha demostrado que *in vitro*, la ET-1 actúa como un secretagogo de la mucosa colónica humana [75]. Los experimentos de competencia sugieren que en la mucosa colónica coexisten las dos poblaciones de receptores de las ET [76] y se ha encontrado que algunos individuos que padecen la enfermedad de Hirschsprung o megacolon agangliónico, exhiben mutaciones de los receptores ET_B [77].

De particular interés resulta el hecho de que en el colon humano adulto se encuentra expresión de la enzima convertidora de endotelinas 1 (ECE-1) [78]. Así, la combinación de estudios de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica demostraron que en el epitelio y los ganglios entéricos del colon humano normal existen grandes cantidades de ECE-1. En un trabajo más reciente, Egidy y colaboradores, estudiaron la expresión génica de los receptores de las ET (ET_A y ET_B), la PPET-1 y la ECE-1 en colon normal humano. Este grupo también analizó la localización celular de los mismos utilizando combinación de técnicas de inmunohistoquímica, hibridación *in situ* y autoradiografía [79].

1.6 Péptidos natriuréticos en el tracto gastrointestinal

Si bien no se han reportado muchos antecedentes en relación con los PN en el tracto gastrointestinal, se ha reportado inmunorreactividad de ANP en estómago, intestino delgado y grueso de rata, yeyuno y colon de conejillo de indias [182], estómago, duodeno, yeyuno, colon y recto humanos [183]. Asimismo, se demostraron sitios de unión específicos para ANP en las vellosidades del yeyuno, el duodeno, el íleon y en cultivos de células ileales de rata [184], [185]. Por otra parte, se ha reportado expresión génica para ANP en el estómago, intestinos (delgado y grueso) y el recto/ano de rata [186], [187]. En la mucosa colónica, se ha descrito la síntesis local de CNP, sugiriendo que el mismo podría tener una función paracrina como regulador local de su motilidad [188]. Más recientemente, estudios *in vivo* en el tracto gastrointestinal murino determinaron que, tanto el píloro como el intestino grueso incrementan

los niveles de GMPc luego de la administración de CNP, postulándose que contribuiría al vaciado gástrico [189].

1.7 Cáncer colorrectal

1.7.1 Neoplasia

Los procesos neoplásicos se caracterizan por el crecimiento celular en el que se verifican alteraciones debidas a mutaciones genéticas. Casi todas las mutaciones que conducen al desarrollo tumoral son mutaciones somáticas adquiridas. Éstas se encuentran en el seno del tumor, pero no afectan la mucosa subyacente de la que ha surgido la neoplasia.

Las neoplasias o procesos tumorales, pueden ser benignos o malignos. Los primeros no son cancerosos ya que las células de este tipo no se diseminan a otras partes del cuerpo, generalmente se pueden extirpar y en la mayoría de los casos no reaparecen. Un ejemplo de tumor benigno son los adenomas (del griego ἀδῆν, adēn, “glándula”), éstos son tumores epiteliales que se asemejan a los tejidos glandulares.

Por el contrario los tumores malignos son cancerosos. Sus células poseen anomalías, se dividen sin orden ni control, pueden invadir y destruir el tejido circundante, ingresar al torrente sanguíneo o al sistema linfático y por estas vías diseminarse a otros órganos. Un adenocarcinoma, por ejemplo, es un tumor maligno de un epitelio glandular, como el colónico.

Para tipificar la evolución de las lesiones que pueden derivar en cáncer colorrectal, se resumen a continuación los principales estadios del proceso:

Focos de criptas aberrantes: comprenden lesiones focales de las criptas. Éstas exhiben fenómenos proliferativos e hiperplásicos con diferentes grados de displasia. Las luces de las criptas están dilatadas y en ocasiones de contornos irregulares, poseen abundantes figuras mitóticas y disminuye el número de células mucosas. Eventualmente pueden evolucionar en pólipos adenomatosos y posteriormente, en CCR.

Adenocarcinoma in situ: estos carcinomas se originan en el epitelio glandular, pero no atraviesan la capa basal y por lo tanto no se ha extendido.

Adenocarcinoma intramucoso: las células cancerosas atraviesan la capa basal y el carcinoma invade la lámina propia, aunque permanece confinado a la mucosa.

Adenocarcinoma invasivo: en estos, las células cancerosas atraviesan la muscular de la mucosa, alcanzado la submucosa. Al estar esta capa provista de abundantes capilares sanguíneos y linfáticos, el carcinoma tiene potencial invasivo hacia otros órganos.

1.7.2 Focos de Criptas Aberrantes (FCA)

Constituyen las primeras lesiones neoplásicas identificables en el modelo de carcinogénesis de colon. La progresión de los FCA hacia pólipos y el posterior desarrollo del cáncer, está ligada a la acumulación de alteraciones bioquímicas y mutaciones por lo que sólo una pequeña fracción de los FCA evolucionan a cáncer de colon [80]. Los FCA fueron descritos por Bird en 1987 en el colon de ratones sometidos al tratamiento con azoximetano (AOM) [81], [82]. Utilizando estereomicroscopía de mucosas colónicas tratadas con azul de metileno, Bird visualizó grupos de criptas irregulares fuertemente teñidas, con revestimientos epiteliales gruesos y lúmenes frecuentemente alterados. En ese trabajo, se identificaron criptas aberrantes y postuló que éstas serían posibles precursores del cáncer de colon [81], [83]. Posteriormente, Pretlow y Roncucci fueron los primeros en establecer la presencia de los FCA en especímenes quirúrgicos humanos, los que exhibían similitudes con las halladas en roedores [84], [85]. Los FCA están, a menudo, ligeramente elevados por encima de la mucosa normal y tienen aberturas irregulares, visiblemente dilatadas, circulares, ovals o en forma de hendidura [86], [87]. Además de la elevación de la mucosa, un FCA individual ocupa al menos el doble de la superficie de una cripta normal [88].

Los FCA muestran características histológicas variables, que fueron caracterizadas por Kudo y colaboradores [89]. Coincidiendo con la distribución del CCR, los FCA son más frecuentes en colon distal, tanto en modelos animales experimentales como en humanos. En los FCA, varios marcadores proteómicos pueden exhibir alteraciones, sugiriendo modificaciones patológicas. Estos marcadores incluyen calreticulina, transgelina, serotransferrina, trifosfato isomerasa, anhidrasa carbónica II, antígeno carcinoembrionario, β -catenina, cadherina placentaria (cadherina P), cadherina epitelial (cadherina E), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ciclooxigenasa (COX-2) y p16INK4a. Las mutaciones genéticas de K-ras, B-Raf, APC y p53 se han demostrado en FCA. También se verifican alteraciones epigenéticas, como la metilación de las islas CpG, incremento en la inestabilidad genómica, inestabilidad de microsatélites, pérdida de heterocigosidad y deficiencias en el sistema de la reparación del genoma [80].

1.7.3 Secuencia adenoma-cáncer

A nivel molecular, la secuencia que conduce de los adenomas al cáncer, se da como un proceso de acumulación de defectos genéticos en el epitelio intestinal. Éstos ocasionan un deterioro progresivo del control del ciclo celular y del mantenimiento de la estabilidad genómica. El evento inicial implica mutaciones somáticas de los componentes de la vía de señalización Wnt, que generalmente incluyen el gen APC. El producto de este gen, a través de sus asociaciones con el sistema microtubular y con otros componentes de esta vía de señalización, desempeña un papel clave en la regulación de la estabilidad cromosómica y la proliferación celular. La pérdida

de la función normal de APC da como resultado la segregación cromosómica anormal durante la mitosis y la estabilización del *pool* citoplasmático de β -catenina, que activa múltiples genes implicados en la promoción de la proliferación celular y la supervivencia. Por lo tanto, las células epiteliales portadoras de estas mutaciones se caracterizan por la inestabilidad cromosómica, desequilibrio alélico, aumento de las tasas de proliferación e incremento de la supervivencia celular. Estas anomalías preparan el escenario para las mutaciones adicionales, tales como la activación de K-ras, el silenciamiento de genes supresores de tumores en el cromosoma 18q21 y la inactivación de p53, lo que resulta en una mayor desestabilización genómica y deterioro del control de la proliferación celular. Por lo tanto, los fenotipos cancerosos emergentes, se caracterizan por exhibir aneuploidía, desequilibrios alélicos y translocaciones cromosómicas, que originan tanto ganancias como pérdidas [90].

1.7.4 Displasia

La displasia se define como una constelación de cambios histológicos indicadores inequívocos de transformaciones epiteliales de tipo neoplásico. Sin embargo, estas transformaciones se mantienen confinadas al compartimiento epitelial en el que se originan. Así, se manifiestan como cambios histológicos que implican la presencia de alteraciones genéticas clonales, en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular, así como predisposición a la progresión neoplásica [91].

La diferenciación celular anormal se manifiesta por la disminución o, menos frecuentemente, el incremento de la producción de mucina por las células caliciformes, que dificulta la distinción fenotípica de las células absortivas y caliciformes, así como una inapropiada diferenciación de las células endócrinas. Los núcleos normalmente se encuentran formando acúmulos, se tiñen fuertemente y exhiben una pérdida de la relación núcleo-citoplasma. La displasia en los adenomas se clasifica en niveles, de bajo y alto grado, en base a criterios histológicos tomados de la clasificación de la displasia en la enfermedad inflamatoria intestinal [92]. La distinción entre grados, se basa principalmente en la conservación o la pérdida de la polaridad celular y el grado de severidad de las anomalías citológicas. En las displasias leves los núcleos, aunque agrandados, elongados y formando acúmulos; están dispuestos uniformemente en la región basal de las células epiteliales (Figura 6A). En las displasias de alto grado, los núcleos usualmente son de mayor tamaño, más heterogéneos, se estratifican sin orden ni concierto y muchos adoptan una ubicación apical. Citológicamente exhiben elevado grado de atipia, con membranas nucleares irregulares, macronúcleolos y figuras mitóticas anormales. Estas zonas, también se conocen como carcinomas *in situ* (Figura 6B). El concepto tiene un interés especial ya que se considera que éstos son susceptibles de ser curados con su extirpación.

1.7.5 Adenocarcinoma intramucoso

Entre los adenomas, el adenocarcinoma intramucoso se caracteriza por la presencia de células neoplásicas que invaden la lámina propia, pero no alcanzan la submucosa (Figura 6C). A pesar de que implican una etapa agravada de la neoplasia y son capaces de generar metástasis en otros órganos, además del intestino grueso, los estudios de seguimiento han demostrado que la polipectomía completa es curativa debido a que la gran mucosa intestinal está prácticamente desprovista de canales linfáticos, limitando el acceso de las células cancerosas a esta ruta de difusión [93].

1.7.6 Adenocarcinoma invasivo

En la jerga médica, la denominación "pólipo maligno" se refiere a los adenomas que albergan adenocarcinomas invasivos, es decir, aquellos en los que las células cancerosas atraviesan la capa muscular de la mucosa colorrectal, lo cual es una condición necesaria para que se produzca la metástasis (Figura 6D y E).

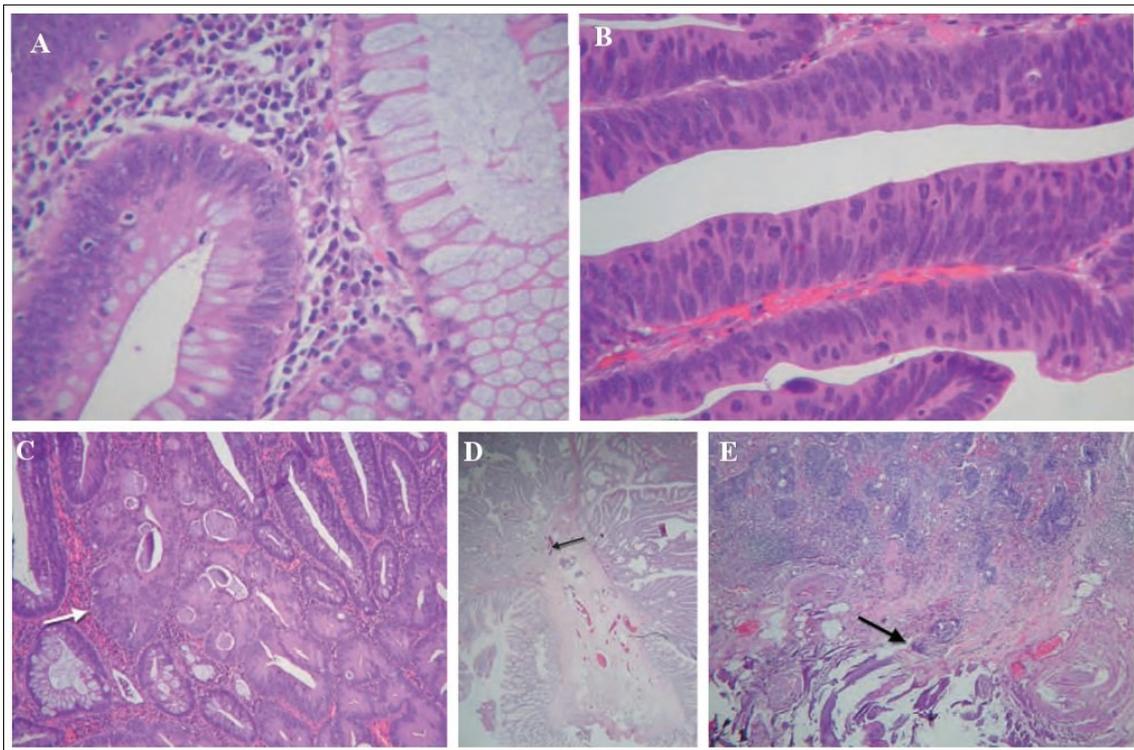


Figura 6. Imágenes de H&E de lesiones colónicas. A) Displasia de bajo grado (izquierda) contrastada con tejido normal (derecha). B) displasia de alto grado mostrando colonocitos indiferenciados con núcleos estratificados, muchos de ellos ocupando la porción apical de las células epiteliales. C) displasia de alto grado con carcinoma *in situ* (flecha). D) adenoma que contiene adenocarcinoma moderadamente diferenciado invadiendo la parte superior del tallo (flecha). E) adenoma que contiene adenocarcinoma pobremente diferenciado; (Figura modificada de Waye y col., 2009 [94]).

La difusión hacia las capas más profundas de la pared del colon puede producirse por extensión directa. En los adenomas pediculados, los adenocarcinomas invasivos entran en contacto con la

submucosa de la cabeza y del tallo del pólipo (Figura 7A), mientras que en los adenomas planos y sésiles los adenocarcinomas invasivos están en contacto directo con la submucosa de la pared intestinal, considerándose más agresivos que los primeros (Figura 7B y C).

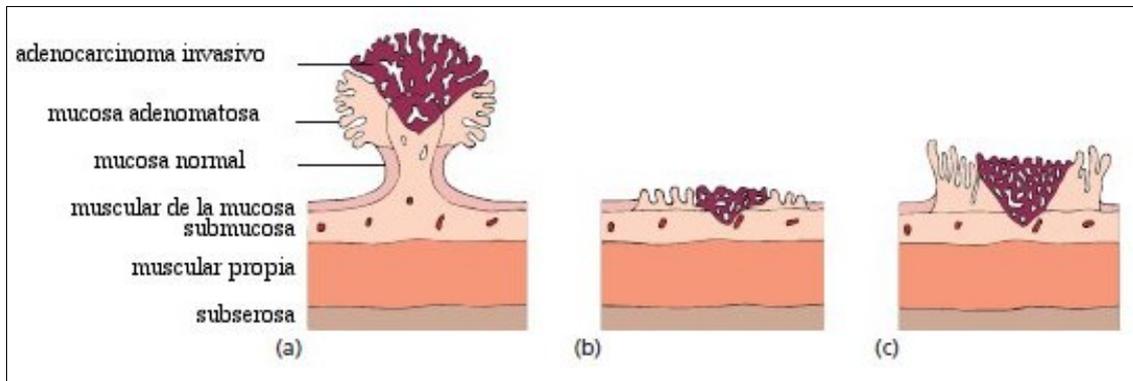


Figura 7. Variantes de pólipos malignos. (A) Pólipo maligno pediculado con invasión en la submucosa del adenoma polipoide. (B) Adenocarcinoma que proviene de un adenoma plano e invade la submucosa. (C) Pólipo maligno sésil con adenocarcinoma que invade la submucosa; (Figura modificada de Waye y col., 2009 [94]).

1.7.7 Estadificación anatomopatológica del cáncer colorrectal

La estadificación del cáncer intenta describir su extensión en el organismo y es uno de los parámetros claves para su pronóstico y para definir las opciones terapéuticas. En el caso del CCR, la caracterización se basa en el grado de invasividad en pared intestinal que alcanza el proceso.

El sistema de estadificación más comúnmente utilizado para el CCR es el propuesto por el Comité Americano Conjunto sobre el Cáncer (AJCC) [95], también conocido como el Sistema TNM. Este sistema se basa en tres parámetros claves. Con la letra T se describe el grado de avance del tumor principal (primario) en la pared intestinal. Estas capas, desde el lumen hacia la periferia, incluyen el revestimiento interno (mucosa), la capa muscular de la mucosa, la submucosa, la muscular propia y externamente, las capas delgadas de tejido conectivo (subserosa y serosa) que cubren la mayor parte del colon, exceptuando el recto.

Las categorías son: T0 (o Tis) que indica que el cáncer se encuentra en una etapa temprana, es decir no ha avanzado más allá de la muscular de la mucosa; T1 representa que éste se ha extendido hasta la submucosa; T2 cuando invade la submucosa y se extiende hasta la muscular propia; T3 si el crecimiento avanza sobre la muscular propia y en las capas más externas del colon o del recto, sin llegar a abarcar órganos o tejidos circundantes y T4 cuando el cáncer atraviesa la serosa. También se incluye la categoría Tx, cuando resulta imposible describir el grado de extensión del tumor.

La letra N representa el grado de afectación de los ganglios linfáticos cercanos (regionales), dando cuenta de si el proceso se ha diseminado hacia éstos, y si es así, el número de ganglios implicados.

Finalmente, la letra M indica si existen procesos de metástasis en otros órganos del cuerpo o en los ganglios linfáticos distantes. Potencialmente el CCR puede propagarse a casi cualquier parte del organismo, aunque los sitios más comunes de propagación son el hígado y los pulmones.

Los números que se colocan a continuación de las letras T, N y M proporcionan una idea del grado de afectación del cáncer. Los números del 0 al 4 son indicadores de gravedad creciente, mientras que la letra “x” significa que éste no puede ser evaluado por carecer de información concreta.

1.8 Modelos murinos de CCR

El CCR es un proceso patológico de desarrollo lento, cuyo inicio se verifica en las células epiteliales y que en un primer estadio, evoluciona desarrollando criptas aberrantes. Éstas pueden dar lugar a adenomas, generar carcinomas *in situ* y si el proceso se agrava, producir metástasis en órganos vecinos o distantes. Para poder estudiar el proceso, se han desarrollado una variedad de modelos *in vitro* e *in vivo* de CCR que intentan emular tanto la etiología como la patobiología de los tumores humanos. En general, los modelos *in vitro* permiten analizar aspectos específicos de la biología del tumor, independientemente del contexto tisular. Mediante estos estudios se realizan análisis funcionales de genes relevantes o evalúan los efectos de los mediadores endógenos. Estas estrategias son muy utilizadas para analizar el efecto de compuestos farmacológicos, resultando más simples y rápidos que en el organismo intacto. Sin embargo, los modelos *in vitro* sólo permiten reflejar algunos aspectos parciales del desarrollo tumoral, dependiendo de la etapa del proceso a partir de la cual se han originado. El uso de líneas celulares, restringen el modelo a las etapas del tumor con suficiente potencial de crecimiento intrínseco, es decir las fases de carcinoma y en forma más restringida, las de adenomas. Por el contrario, los cultivos primarios, que guardan mayor similitud con las poblaciones celulares *in vivo*, pueden ser obtenidos a partir de cualquier etapa, incluyendo epitelios normales [96]. Así, la principal desventaja de los modelos *in vitro*, cuando se investiga una enfermedad compleja como el CCR, es la pérdida del contexto tisular que afecta el crecimiento del tumor y la metástasis.

Por el contrario, la capacidad de inducir de forma fiable los tumores de colon en modelos *in vivo* proporciona la oportunidad de estudiar diversos aspectos de la carcinogénesis y aún del proceso metastásico tal como ocurre en CCR humano, aunque por lo general resulta difícil reproducir ambos.

Con el objetivo de estudiar diversas características de esta patología en humanos, al presente se han desarrollado muchos modelos de CCR en roedores. Éstos pueden ser animales modificados genéticamente por ejemplo, las cepas Min/ Δ APC-*mouse*, que reproducen el desarrollo de tumores a partir de células epiteliales iniciadas (mutadas) [97]–[102]; modelos xenográficos, que reflejan el crecimiento del tumor y la metástasis, aunque sólo es factible el uso de células malignas que tienen suficiente potencial de crecimiento intrínseco para formar tumores en animales huésped [103], [104], o modelos inducidos químicamente. En éstos últimos, el agente inductor actúa sobre el epitelio normal, promoviendo la formación de los carcinomas a través del proceso de múltiples etapas descrito anteriormente, aunque sólo raramente se logran reproducir los procesos de metástasis. Los carcinógenos químicos más ampliamente empleados para inducir lesiones de colon similares a las humanas son las aminas heterocíclicas [105]–[107], las aminas aromáticas [108], [109], la alquilnitrosamida [110] y la dimetilhidracina [111] o su metabolito, el azoximetano (AOM) [1], [112], [113].

El modelo murino descrito por Tanaka y otros [1], utiliza una única inyección intraperitoneal de AOM seguida de la administración oral de sulfato de sodio dextrano (SSD) en el agua de bebida. La administración de esta combinación de compuestos, se ha probado que provoca la formación de tumores en el colon distal de ratones [114]. El metabolismo de este carcinógeno genera sustancias citotóxicas para los colonocitos a las pocas horas de su administración. Esta etapa inicial se caracteriza por cambios en la homeostasis del epitelio intestinal que conducen al aumento de la proliferación celular. En las primeras veinte semanas posteriores a la inyección de AOM, este modelo permite discriminar la formación de focos de criptas aberrantes, los que constituyen cambios morfológicos tempranos típicos que preceden el desarrollo del cáncer, microadenomas, adenomas y carcinomas (Figura 8).

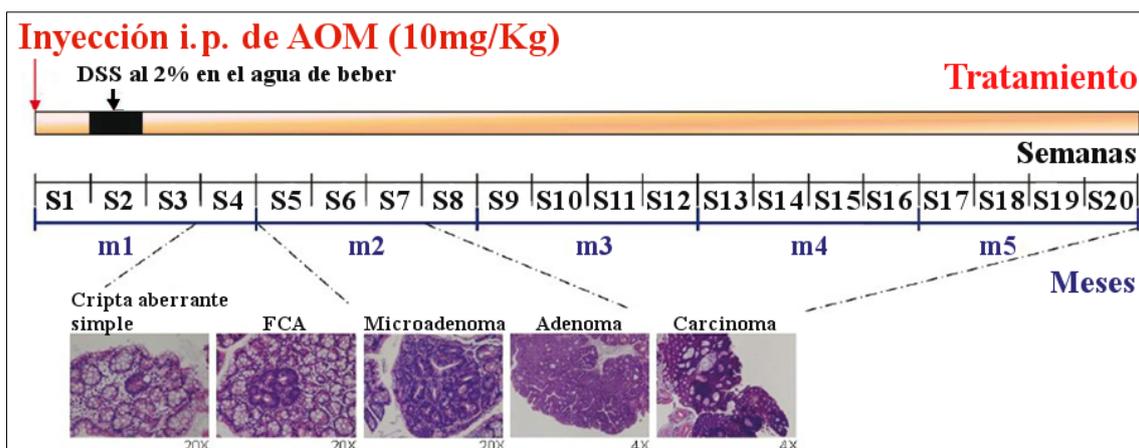


Figura 8. Esquema del modelo de inducción del CCR de Tanaka y col. (2003); (Figura modificada de De Robertis y col., 2011).

1.9 Sistema Endotelinas en cáncer

1.9.1 Receptores de las ET en cáncer

Se ha demostrado que las células epiteliales tumorales expresan receptores de las ET y que los fibroblastos y las células endoteliales asociadas a este cáncer pueden reforzar las señales de las mismas y por lo tanto, contribuir al crecimiento y neovascularización en el cáncer colorrectal [115]. En función de estos antecedentes, el rol crítico de las ET y la relevancia terapéutica de la utilización de antagonistas de los receptores de las ET en un amplio rango de patologías han abierto el camino para la generación de nuevas terapias moleculares para el tratamiento de distintos tipos de cáncer [116]. En la Tabla 1 se resumen algunos cánceres que afectan a humanos y el patrón de expresión de los receptores de las ET, así como los fenotipos asociados que los caracterizan.

Tabla 1. Expresión de los receptores de las ET en cánceres Humanos. CPCNP: Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas. CPCP: Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas, (Tabla modificada de Rosanò y col, 2013).

Tipo de Tumor	Receptor de las ET expresado	Fenotipo asociado con la expresión del/los receptor/es de las ET
Vejiga	ET _A [117] y ET _B [118]	Reducción de la supervivencia [117]
Glioblastoma	ET _A y ET _B [119]; [120]	No reportado
Mama	ET _A [121], [122]	Reducción de la supervivencia e incremento de las metástasis óseas [121], [122]
Cervical	ET _A [123]	No reportado
Colorrectal	ET _A [124] y disminución de ET _B [115]	Incrementado grado tumoral y supervivencia reducida [124].
Hepatocelular	Pérdida de ET _B [125]	No reportado
Gástrico	ET _A [126] y pérdida de ET _B [127]	No reportado
Cabeza y cuello	ET _A [128]	Supervivencia reducida [129]
Pulmón	ET _A (CPCNP) [130] y ET _B (CPCP) [131]	Supervivencia reducida(NSCLC) [130]
Melanoma	ET _B [132]	Fenotipo agresivo y metástasis a los nódulos linfáticos [132]–[134]
Ovario	ET _A [135]	Grado tumoral incrementado, quimioresistencia y metástasis [135]–[138]
Próstata	ET _A [139]	Grado tumoral incrementado y metástasis a los huesos [139]–[141]
Renal	ET _A [142] y ET _B [143], [144]	ET _A está asociado con el grado tumoral [142] y ET _B está asociado con la supervivencia del paciente [144], [145]

Vulvar	ET _B [146]	Supervivencia reducida [147]
--------	-----------------------	------------------------------

1.9.2 ET-1 en cáncer

Al presente, se ha probado que ET-1 participa en el crecimiento y la progresión de una variedad de tumores tales como los de próstata, ovario, renal, pulmonar, colorrectal, de cuello uterino, de mama, de vejiga, carcinomas endometriales, sarcoma de Kaposi, tumores cerebrales, melanoma y metástasis óseas.

Así, adicionalmente a su rol como potente vasoconstrictor endógeno y mediador de desórdenes vasculares y renales, [148]–[150], se ha postulado que el sistema de las endotelinas tendría un papel relevante en varios tipos de patologías cancerosas. Se ha demostrado que la ET-1 se sobreexpresa tanto en cánceres humanos *in vivo* como *in vitro*, postulándose efectos mitogénicos [151]–[153]. Vía la activación del receptor ET_A, la ET-1 facilitaría varios aspectos del crecimiento y la progresión del cáncer, incluyendo la activación de la proliferación celular aberrante, el escape de la muerte celular programada, la formación de nuevos vasos, la modulación del sistema inmune, la osteogénesis anormal, la invasión y los procesos metastásicos (Figura 9) [4], [149].

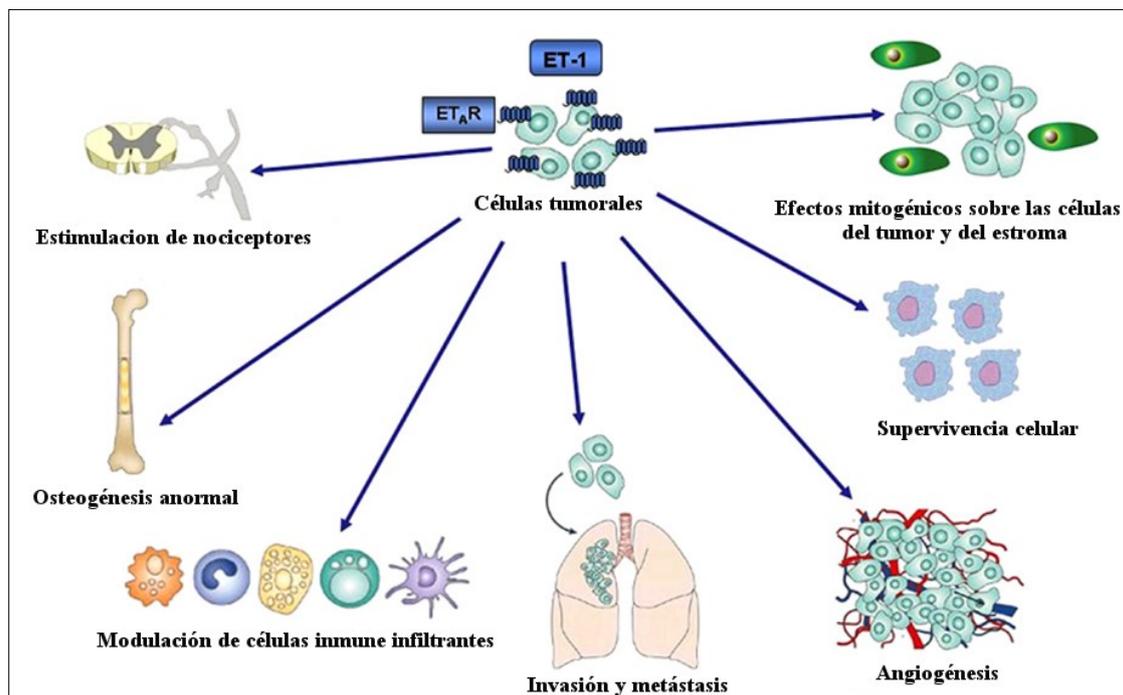


Figura 9. Acciones de ET-1 en el desarrollo de diversos cánceres; (Figura modificada de Bagnato y Rosanò, 2008).

1.9.3 ET-2 en cáncer

Si bien ET-1 ha sido la principal isoforma estudiada en el cáncer, actualmente existe un interés creciente para evaluar del rol de la ET-2, en su patogénesis. El comienzo de esta tendencia se

inició con el reporte que la expresión de la ET-2 se encuentra incrementada en cánceres mamarios humanos [154]. Normalmente ET-2 no se encuentra expresada en esta glándula, pero estos autores encontraron que las áreas hipóxicas de tumores mamarios murinos HTH-K, están particularmente asociados con el aumento de la expresión de las ET [154]. En este estudio, se encontró que la expresión de la ET-2, de ET_A y de ET_B aumenta en condiciones de hipoxia, mientras que las de ET-1 y ET-3 no se vieron afectadas. La elevación de ET-2 también se presenta en otros tipos de cánceres, tales como el de piel, en el que la expresión de ET-2 se triplica en el carcinoma de células basales, en comparación con la piel normal [155]. Además de la regulación de los procesos apoptóticos, se ha demostrado que ET-2 afecta el potencial invasivo y metastásico de las células del cáncer mamario [156]. Adicionalmente, existen estudios demostrando que la ET-2 vía el receptor ET_B actúa como quimioattractante para macrófagos, promoviendo mayor invasividad [157]. En ambos casos, la respuesta está mediada por la vía MAPK, corriente abajo de ET_B. Sin embargo, su comportamiento exhibe algunos aspectos particulares ya que si bien en algunos tipos de cáncer aumenta su expresión, en otros, como en el CCR, se ha postulado su silenciamiento [158].

1.10 El sistema de las Endotelinas en el cáncer colorrectal

1.10.1 Receptores de las ET en el cáncer colorrectal

Como se describió previamente, los receptores de las ET se expresan en ciertos tumores. En algunos tipos, se sobreexpresan en relación con los niveles que exhiben en el tejido normal, mientras que en otras situaciones se produce una subexpresión o aún el silenciamiento. En comparación con el colon normal, en el CCR el receptor ET_A se encuentra sobreexpresado en todos los tipos celulares [115]. Estos estudios mostraron que la unión de radioligandos al receptor ET_A es más alta en los fibroblastos de los vasos sanguíneos asociados al cáncer y más débil en las células epiteliales cancerosas. Por el contrario, el receptor ET_B exhibe considerables niveles de expresión en el colon normal, pero disminuye marcadamente en los vasos sanguíneos asociados con el cáncer, en fibroblastos y menos marcadamente, en las células epiteliales. Estos resultados son concordantes con hallados en líneas celulares humanas de CCR [159].

1.10.2 ET-1 en cáncer colorrectal

Los estudios de Ali y colaboradores demostraron que la estimulación del crecimiento de cultivos de líneas celulares humanas de CCR (LIM1215 y HT29) por ET-1 es mediada por el receptor ET_A [159]. En este estudio se demostró que los antagonistas de ET_A, BQ123 y BQ610, inhiben la proliferación inducida por ET-1. Los estudios *in vivo* [160], demostraron que tanto los pacientes con tumores colorrectales primarios, como aquellos con metástasis hepáticas, poseen niveles plasmáticos de ET-1 significativamente incrementados, en relación con los

controles. En este mismo estudio, ratas a las que se les administró por vía intraportal el antagonista de ET_A, BQ123, mostraron inhibición significativa de los procesos de proliferación celular. Estudios más recientes proponen que la ET-1 actúa como factor antiapoptótico en cánceres colorrectales [161]. En este estudio, líneas celulares de carcinomas colorrectales humanos (HT29 y SW640) tratadas con Bosentan, un inhibidor de ambos receptores, demostraron que la ET-1 no induce proliferación celular en cáncer de colon humano, pero incrementan la supervivencia celular vía la supresión de la apoptosis inducida por FasL. Los estudios con varias líneas celulares de cáncer colorrectal (HT29, LIM1215 y SW620) cultivadas en presencia de ET-1 e inhibidores de los receptores ET_A y ET_B, mostraron que la ET-1 estimula significativamente el crecimiento de todas las líneas celulares vía los receptores ET_A [162]. Asimismo, se demostró que el crecimiento estimulado por la ET-1 es inhibido por antagonistas de los subtipos de proteínas G, de la fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K) o de la proteína quinasa C (PKC) y se probó que la inhibición del receptor de EGF, reduce el efecto de la ET-1. Por otra parte, ET-1 promueve el incremento de los niveles de fosforilación del receptor de EGF vía el receptor ET_A. En este estudio se concluye que la ET-1 actúa, vía el receptor ET_A, potenciando el proceso de replicación del ADN de las células de CCR. Los estudios de inmunocitoquímica y autoradiografía combinados para identificar los receptores ET_A y ET_B en los distintos tipos celulares de CCR, demostraron que excepto las fibras nerviosas, los niveles de expresión de los receptores ET_A se encuentran incrementados en las células epiteliales cancerosas, los fibroblastos y las células endoteliales asociadas al cáncer, lo que favorecería la señalización de ET-1 contribuyendo al crecimiento y la neovascularización del CCR [115].

1.10.3 ET-2 en cáncer colorrectal

Estudios recientes han demostrado que en el CCR, tanto la ET-2 como la ET-3 se inactivan por silenciamiento epigenético [158]. El silenciamiento de los genes de ambos péptidos (EDN2 y EDN3) está claramente implicado en la desaparición de ambas isoformas en tumores de colon humano y de rata. Este modelo de carcinogénesis de colon de rata proporciona información sobre el momento en que ocurre el silenciamiento epigenético de ET-2 y ET-3, mostrando claramente que éste precede el desarrollo de tumores.

1.11 Péptidos natriuréticos en el cáncer

Tanto los péptidos natriuréticos como las endotelinas son producidos como prohormonas, codificadas en genes independientes para cada uno de los péptidos bioactivos y su distribución y regulación en los tejidos, son también únicas para cada uno de ellos. Sin embargo, poseen efectos fisiológicos marcadamente antagónicos, aunque de alguna manera pueden considerarse complementarios.

En contraposición con las endotelinas, se ha demostrado que ANP inhibe el crecimiento de células cancerosas en estudios *in vitro* [190]–[195]. La acción antiproliferativa de ANP ha sido extensamente demostrada en varias formas de cáncer humano, incluyendo adenocarcinoma pancreático, de mama, próstata, colon, renal, de ovario y de células pulmonares (pequeñas y escamosas) [196].

Dada las funciones antagónicas de ambos sistemas, es posible que en condiciones fisiológicas exista un mecanismo de retroalimentación entre éstos. Tal mecanismo podría encontrarse alterado en la patología. Debido a que el ANP y el CNP son, de la familia de péptidos natriuréticos, las hormonas más ligadas al intestino y debido a la extensa y poco explorada relación que vincula un sistema con otro, en la presente tesis se estudiaron ambos ligandos tanto en condiciones fisiológicas como patologías.

2. Hipótesis

En la presente tesis se hipotetiza que el desarrollo del cáncer colorrectal provoca marcados cambios en la síntesis y secreción de ET-1, ET-2 y sus receptores. Se postula que dichos cambios están implicados en la retroalimentación positiva del desarrollo de la patología. Para corroborar esta hipótesis, se planteó profundizar (mediante la combinación de técnicas de microscopía óptica y de biología molecular) el análisis del rol que desempeñan las endotelinas tanto en condiciones normales como durante el desarrollo del CCR en un modelo *in vivo*.

Adicionalmente, debido a que en la mayoría de los sistemas estudiados, las funciones de los péptidos natriuréticos y las endotelinas son antagónicas, se postula que el desarrollo del CCR altera la expresión de ambos péptidos a lo largo de la patología.

El CCR modifica el ordenamiento de las fibras colágenas en el tejido afectado. Utilizando microscopía óptica no lineal es posible la detección selectiva de las mismas. En este aspecto, se planteó analizar la capacidad de ésta nueva tecnología para detectar lesiones tempranas, apostando en un futuro, al desarrollo de técnicas de diagnóstico más efectivas y menos invasivas.

3. Objetivos

3.1 Generales

Profundizar el conocimiento sobre el rol que ejercen las endotelinas y sus receptores en las criptas intestinales, tanto en condiciones normales como patológicas, especialmente en el CCR.

3.2 Específicos

- ◆ Corroborar y clasificar las características morfológicas del colon murino utilizando microscopías ópticas lineales y no lineales.
- ◆ Caracterizar las fases del desarrollo del modelo del CCR murino inducido por AOM/SSD utilizando microscopias ópticas lineales y no lineales.
- ◆ Cuantificar el patrón de expresión génica del sistema de las endotelinas en el colon tanto en condiciones normales como patológicas, utilizando la técnica de retrotranscripción seguida de PCR de punto final (RT-*sq*PCR).
- ◆ Determinar el patrón de expresión de los péptidos en colon en condiciones normales y patológicas utilizando técnicas de inmunofluorescencia.
- ◆ Analizar la relación endotelinas– péptidos natriuréticos en el colon normal y patológico.
- ◆ Analizar si las metodologías implementadas podrían emplearse como biomarcadores de diagnóstico temprano del CCR.

4. Materiales y métodos

En el diagrama de flujo que se presenta a continuación se resumen las estrategias experimentales que fueron desarrolladas en la presente tesis. Brevemente, fueron empleados ratones BALB/cCmedc en dos situaciones: animales normales e inducidos químicamente a desarrollar cáncer colorrectal. En ambos casos se estudiaron las características morfológicas de los tejidos con diferentes técnicas de microscopía y posteriormente la expresión génica y la localización celular de los péptidos y sus receptores.

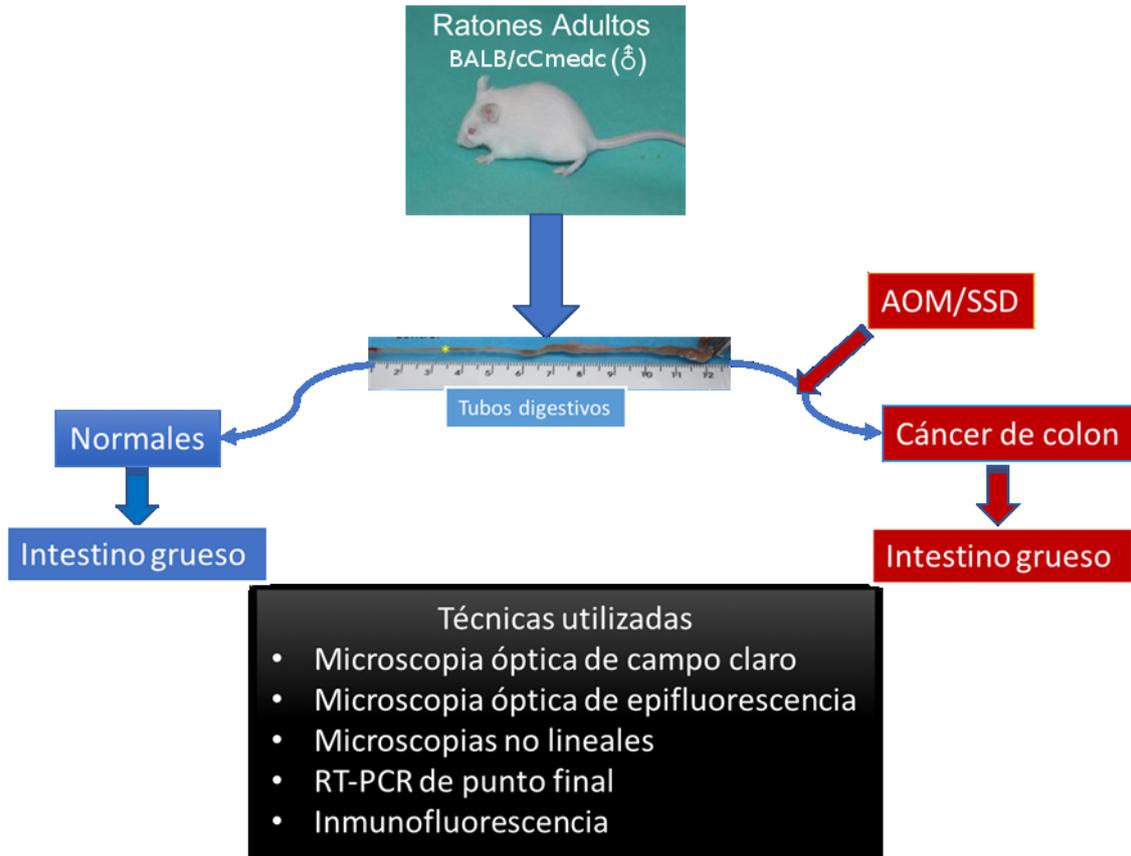


Figura 10. Diagrama de flujo resumiendo las estrategias experimentales utilizadas.

4.1 Modelo experimental

4.1.1 Animales

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

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

En todos los casos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente los intestinos fueron removidos y procesados para los diferentes estudios.

La totalidad de los experimentos fueron realizados siguiendo las pautas sobre cuidado y uso de animales de laboratorio de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio [197] y la ley N° 14346 sobre malos tratos y actos de crueldad a los animales.

4.1.2 Obtención de los segmentos intestinales

Previo reconocimiento, los diferentes segmentos intestinales a estudiar (colon proximal y distal) fueron lavados en una solución helada de PBS (*buffer* fosfato salino) pH 7, seccionados y almacenados de acuerdo a los procedimientos experimentales particulares desarrollados en la presente tesis.

4.1.3 Inducción del cáncer colorrectal por tratamiento con Azoximetano/sulfato de sodio dextrano (AOM/SSD).

El CCR fue inducido a través de la aplicación intraperitoneal de Azoximetano (AOM), un derivado de la 1,2-dimetilhidrazina, seguido de la administración por vía oral de sulfato de sodio dextrano (SSD). El AOM es uno de los agentes más efectivos para inducir el cáncer de colon actualmente en uso [198] y su combinación con SSD ha demostrado ser un protocolo exitoso para la inducción de CCR [107]. En la presente tesis se aplicó el protocolo [97], [114] con leves modificaciones. Los ratones fueron inyectados al día 0 del experimento con una dosis de 10 mg/kg de AOM (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA). La solución madre de AOM fue preparada a una concentración de 50 mg/ml en solución fisiológica. Ésta fue fraccionada en tubos Eppendorf que fueron almacenados a -20 °C hasta su empleo. La solución a inyectar fue preparada a una concentración final de 1,25 mg/ml, permitiendo administrar la dosis indicada, en volúmenes relativamente pequeños (en ningún caso se emplearon volúmenes superiores a 250 µl).

Una semana después de la inyección con AOM, los animales fueron tratados vía oral durante 7 días con SSD (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) diluido al 2% (P/V) (Figura 11). A partir del día de la inyección, los animales fueron sacrificados a las 4, 8, 16 y 20 semanas. Los segmentos intestinales obtenidos fueron sometidos a los mismos procedimientos y se les realizaron los mismos estudios que los tejidos obtenidos de animales normales.

La superficie en la cual fueron inyectados los animales fue descontaminada con hipoclorito de sodio al 10%. Todos los materiales que tuvieron algún contacto con el AOM (jeringas, guantes, tubos eppendorf, viales, etc), fueron colocados en frascos de vidrio con una solución de hipoclorito de sodio al 10% para su inactivación. Posteriormente, todos los materiales y los restos patológicos fueron colocados en las bolsas correspondientes (rojas) debidamente etiquetadas. Los cambios de cama de los animales durante las primeras cuatro semanas fueron rociados con hipoclorito de sodio 10% y eliminados en las bolsas correspondientes. Los residuos así acondicionados, fueron retirados del bioterio por la empresa SOMA S.A. (Planta de Tratamiento Rosario, Av. Ovidio Lagos 7097, Rosario, Santa Fe), contratada por la FI-UNER para el tratamiento de los residuos de los laboratorios de la institución.

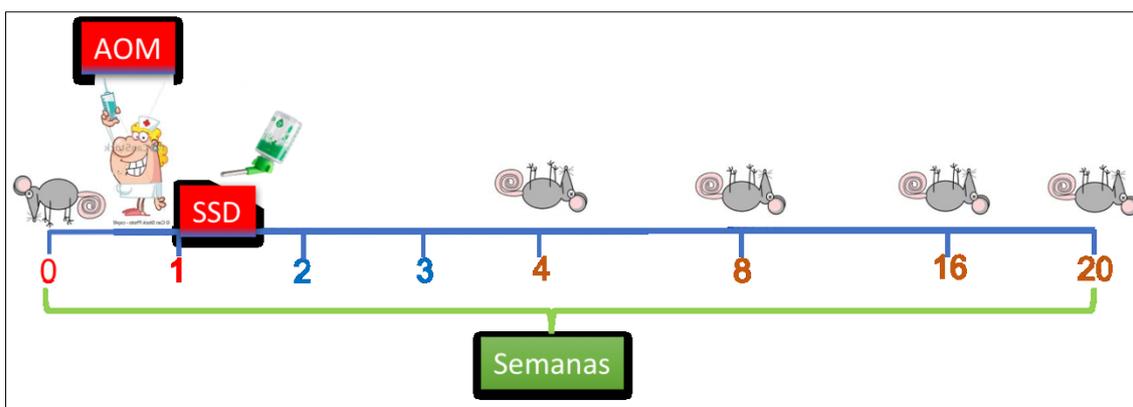


Figura 11. Esquema del modelo de inducción de CCR con AOM y SSD. Los ratones fueron inyectados vía i.p. con AOM el día cero y durante la semana siguiente se suministró el SSD, en el agua de bebida. Las tomas de las muestras se realizaron a las 4, 8, 16 y 20 semanas, a partir de la inyección.

4.2 Técnicas de microscopia

4.2.1 Instrumentación

Para la caracterización histológica del colon normal y las diferentes fases del desarrollo del CCR fueron utilizadas técnicas de microscopia óptica lineal (campo claro y fluorescencia) y no lineal (fluorescencia excitada por dos fotones y microscopia de generación de segundo armónico). Los estudios convencionales de microscopia de campo claro y los de fluorescencia fueron desarrollados con un microscopio de epifluorescencia directo Olympus BX50 (Olympus, Japón), mientras que los estudios de microscopia no lineal fueron realizados empleando un microscopio invertido AxioObserver Z.1 Zeiss, equipado con un cabezal de escaneo confocal Zeiss LSM 780 NLO (Carl Zeiss AG, Alemania).

El microscopio Olympus BX50 (Figura 12), está equipado con una lámpara halógena, una lámpara de mercurio y una torreta para diferentes configuraciones de filtros. Las lentes objetivas son del tipo apocromáticas planas con corrección al infinito. El sistema de registro consta de una

cámara CCD digital Apogee (Andor, Belfast, UK), monocromática, refrigerada, de 14 bits de resolución. El sensor posee una superficie de 512x768 píxeles con un tamaño de píxel de 9 μm . El microscopio posee un mecanismo de posicionamiento electromecánico acoplado a la platina. Esto permite realizar el seccionamiento óptico, obteniendo un desplazamiento preciso y estable de la platina en pasos de hasta 0,10 μm . Todo el sistema está controlado por el *software* SUMDD diseñado para realizar automáticamente las operaciones de seccionamiento, adquisición, almacenamiento y procesamiento [199].



Figura 12. Microscopio de epifluorescencia Olympus BX-50. (1) Lámpara halógena. (2) Lámpara de mercurio. (3) Cámara CDD. (4) torreta de filtros. (5) modulo electrónico. (6) PC de control.

El sistema microscopio invertido - cabezal de escaneo confocal Zeiss LSM 780 NLO (Figura 13) posee como fuente de excitación un láser pulsado de Ti: Safiro (Spectra-Physics, Irvine, EE.UU.) que emite pulsos de 100 fs con una frecuencia de repetición de 80 MHz y potencia media de 2W. Para este trabajo fue seleccionada una longitud de onda de 940 nm, que provee una potencia media de 10 mW sobre la muestra. El haz fue acoplado al cabezal de escaneo luego de pasar por un sistema de lentes convergentes (telescopio de colimación), enfocándose sobre la muestra con un objetivo de inmersión en aceite de 40X/ AN: 1,30 (Carl Zeiss). Las señales transmitidas (*forward*) de generación de segundo armónico (SHG) a 470 nm y de la fluorescencia excitada por dos fotones (TPEF) > 470 nm fueron colectadas por la lente

condensadora de 0,55 NA-WD 26 mm (Carl Zeiss) y registradas simultáneamente por dos detectores en la modalidad *nondescanned detector* (NDD) (las señales no atraviesan el cabezal de escaneo). Por delante de los detectores, fue colocado un filtro pasa bajo SP720 (Omega Filters) para bloquear la luz retrorreflejada del láser, mientras que antes del detector de SHG fue colocado un cubo de filtros con un espejo dicroico pasa alto LP490 nm (Carl Zeiss) y un filtro pasa bajo SP485 nm (Carl Zeiss). Para detectar la fluorescencia fue utilizado otro cubo de filtros con un espejo y un filtro pasa banda BP540 nm \pm 20 nm (Carl Zeiss).

En la Figura 13A se muestra el equipo utilizado para la obtención de las imágenes y un diagrama en bloques del mismo (Figura 13B). También se representan cada una de las señales y se ejemplifican las imágenes de SHG (en rojo) y de la fluorescencia excitada por dos fotones (en verde) (Figura 13C).

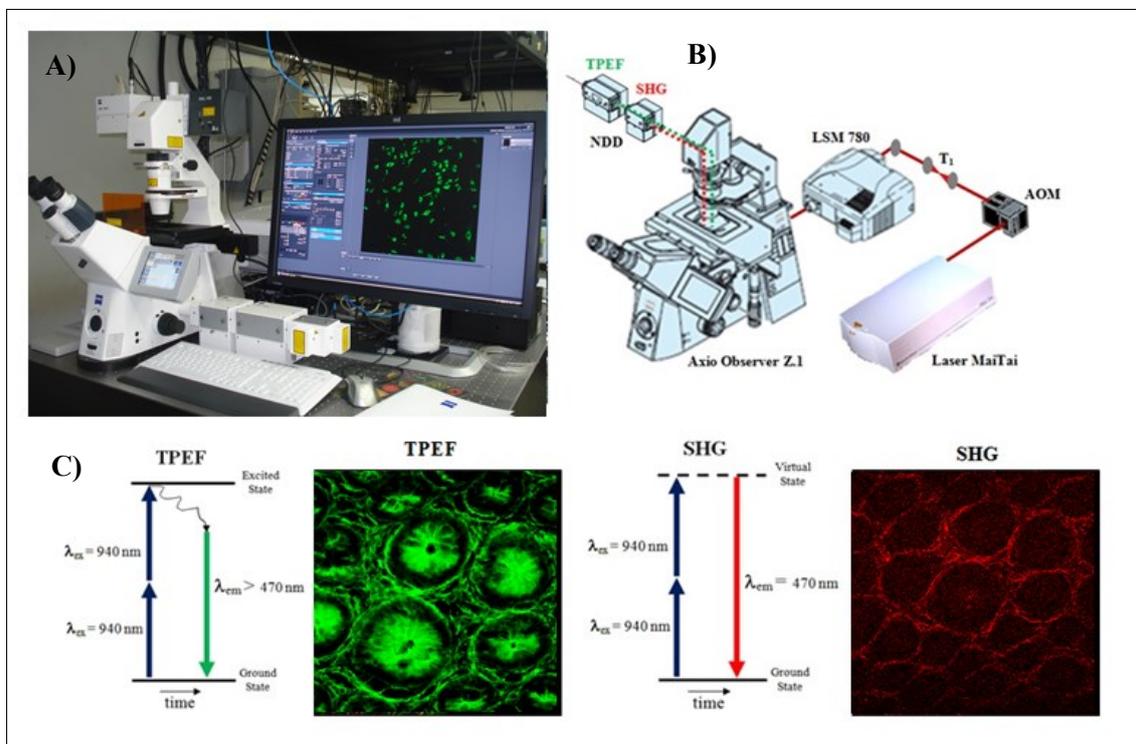


Figura 13. Montaje del sistema de microscopia no lineal. A) Microscopio LSM 780 de Carl Zeiss empleado para la obtención de las imágenes de TPEF y SHG. B) Esquema del microscopio con el láser pulsado acoplado y del camino de las señales de SHG y TPEF transmitidas. C) Diagrama de Jablonski y ejemplos de imágenes obtenidas. TPEF: Fluorescencia excitada por dos fotones, SHG: generación de segundo armónico, λ_{ex} : longitud de onda de excitación, λ_{em} : longitud de onda de emisión. NDD: *nondescanned detector*.

4.2.2 Estudios histológicos y de inmunofluorescencia

Para los estudios histológicos y de inmunofluorescencia los segmentos intestinales fueron fijados por inmersión en Carnoy (etanol 60%, cloroformo 30% y ácido acético glacial 10%) durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente almacenados en una solución de etanol al 70% hasta su inclusión final.

Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en soluciones etanólicas de concentraciones crecientes (70%, 90% y 100%, 3 cambios de 10 minutos cada uno) y luego en xilol (100%, 3 cambios de 10 minutos cada uno). La preinclusión fue realizada en mezclas de xilol - parafina (1:1) durante toda la noche a 60 °C, en parafina pura durante 1 hora a 60 °C, seguida de 6 cambios de parafina fresca a 60 °C durante 30 minutos cada uno. Finalmente, los segmentos fueron incluidos en parafina en moldes diseñados para el seccionamiento y mantenidos a 4 °C hasta su utilización.

Los especímenes fueron seccionados (5 µm) tanto en sentido transversal como longitudinal con un micrótopo Reichert Jung Hn 40 y montados sobre portaobjetos tratados con Silano.

Para los estudios morfológicos, las secciones obtenidas fueron teñidas con dos métodos histopatológicos clásicos:

Hematoxilina y Eosina (H&E):

Las secciones fueron clareadas con xilol 100%, tres cambios de 5 minutos cada uno, rehidratadas en una serie etanólica (100%, 90%, 70%, 50%) durante 3 minutos cada uno y agua destilada durante 3 minutos. Posteriormente, sobre cada sección de tejido fue aplicada una gota de Hematoxilina de Mayer (Álwik), cubriendo todo el espécimen, durante 2 minutos. Transcurrido este período las muestras fueron lavadas con agua corriente y posteriormente fue aplicada la solución de Eosina (Biopur, Rosario, Sta. Fe) por 3 minutos. A continuación, las secciones fueron deshidratadas con una serie de concentraciones crecientes de etanol-agua destilada (50%, 70%, 90%, 100%) durante 3 minutos cada uno, luego clareadas con xilol y montadas con Bálsamo Natural de Canadá.

Ácido peryódico de Schiff (PAS) y azul de alciano (AA):

Las secciones fueron clareadas y rehidratadas como en la tinción de H&E. Sobre las secciones fue aplicada una gota de Azul de Alciano, las que fueron incubadas durante 30 minutos, lavadas con agua destilada durante 5 minutos e incubadas por 17 minutos adicionales con ácido peryódico. Luego de ser lavadas, las secciones fueron tratadas con el reactivo de Schiff durante 20 minutos, lavadas con agua corriente por 5 minutos y sometidas a una coloración de contraste con hematoxilina. Posteriormente las secciones fueron deshidratadas, clareadas con xilol y montadas como se explicó previamente.

Las características evaluadas de las biopsias se resumen en la Tabla 2.

Para llevar a cabo las reacciones de inmunofluorescencia, las secciones de 5µm fueron clareadas y rehidratadas como se describió previamente. Las mismas fueron permeabilizadas con una solución de Tritón X-100 0,3% durante 30 minutos y posteriormente tratadas con sueros normales de cabra o asno inactivados (según el anticuerpo secundario utilizado) durante 40

minutos para bloquear los sitios de reacción inespecíficos. Posteriormente las secciones fueron incubadas durante toda la noche con los distintos anticuerpos primarios (Ver Tabla 3) a 4 °C.

Tabla 2. Resumen de las características de las biopsias analizadas.

	Cambios en la arquitectura	Cambios epiteliales	Cambios de la lámina propia	Cambios en la muscular de la mucosa
Características evaluadas en las biopsias	<ul style="list-style-type: none"> • Orientación y longitud de las criptas • Distancia entre criptas y muscular de la mucosa • Ramificación de las criptas • Transformación vellosa de la superficie de las criptas 	<ul style="list-style-type: none"> • Criptitis y abscesos crípticos • Contenido de mucus • Calidad del mucus (ácido, neutro) • Presencia de linfocitos intraepiteliales • Displasia • Carcinoma 	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de inflamación • Naturaleza de la inflamación (aguda-crónica) 	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma invasivo

Tabla 3. Resumen de los Anticuerpos utilizados en la presente tesis.

Anticuerpo	Características	Dilución	Especificidad
Anti ET-2 Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas (USA)	Anticuerpo policlonal, IgG de cabra	1:50	Humano
Anti ET-1 Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas (USA)	Anticuerpo policlonal, IgG de cabra	1:50	Humano, rata, ratón
Anti ET _A Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas (USA)	Anticuerpo policlonal, IgG de conejo	1:150	Humano
Anti ET _B . Immuno-Biological Laboratorios, Fujioka, (Japón)	Anticuerpo policlonal, IgG de conejo	1:50	Rata, ratón
AntiIgG conjugado a Cy3. Chemicon International Inc. Temecula, California, (USA)	Anticuerpo policlonal, IgG de cabra	1:500	Conejo

AntiIgG conjugado a Cy3. Chemicon International Inc. Temecula, California, (USA)	Anticuerpo policlonal, IgG de asno	1:500	Cabra
Anti ANP 99-126. Cardiovascular Endocrinology Laboratory, University of Ottawa Heart Institute, Ottawa, Ontario (Canada)	Anticuerpo policlonal, IgG de conejo	1:700	Rata, ratón
Anti CNP-22 Peninsula Laboratories, Belmont, (Canada)	Anticuerpo policlonal, IgG de conejo	1:150	Rata, ratón

Al día siguiente, las reacciones fueron lavadas con PBS 1X, 3 cambios de 5 minutos cada uno e incubadas durante 2 h en oscuridad con el anticuerpo secundario correspondiente (ver Tabla 3). Luego de la incubación, las reacciones fueron lavadas con PBS 1X (3 cambios de 5 minutos). Finalmente las secciones fueron incubadas en oscuridad con una solución 1:100 de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), lavadas en PBS 1X y montadas con el antidecayente Vectashield (Vector).

La validación de los anticuerpos fue realizada mediante las siguientes estrategias:

- Elección de los anticuerpos: todos los anticuerpos primarios fueron producidos en una especie distinta a la del tejido diana, evitando de esta manera la detección de inmunoglobulinas endógenas por el anticuerpo secundario. Esto es, para los anticuerpos anti ET-1 y anti ET-2 (producidos en cabra), se utilizó el anticuerpo secundario Anti IgG de cabra (producido en asno) conjugado a Cy3, mientras que para los anticuerpos anti ET_A, anti ET_B, anti ANP 99-126 y anti CNP-22 (producidos en conejo) se utilizó el Anti IgG de conejo (producido en cabra) conjugado a Cy3.
- Control positivo: para los anticuerpos dirigidos contra el sistema de las endotelinas se realizaron reacciones de inmunofluorescencia en múltiples órganos de ratón (incluyendo el intestino), en los que se ha probado su expresión, tal como se indicó en reportes previos del laboratorio [70]. Para los anticuerpos dirigidos contra los péptidos natriuréticos se realizaron reacciones de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia tanto en corazón de rata como de ratón, dichos anticuerpos han sido validados

previamente en reportes del laboratorio [176]. En ambos casos, se eligieron tejidos en los cuales es conocida la presencia de los antígenos a analizar.

- Control negativo: para probar la especificidad del anticuerpo secundario, el anticuerpo primario fue sustituido por sueros totales que es sabido carecen de anticuerpos contra el antígeno problema. En esta tesis, fueron utilizados suero normal de cabra para las reacciones de ET-1 y ET-2 y suero normal de conejo para las de ET_A, ET_B, ANP 99-126 y CNP-22.

Para la validación de la técnica se probaron, sobre secciones de tejidos normales, cuatro diluciones de cada anticuerpo (incluida la sugerida por el proveedor). Este análisis permitió evaluar el comportamiento del anticuerpo en cuanto a sensibilidad, especificidad frente a distintos tipos celulares y nivel de fondo inespecífico. En función de dicho análisis fue elegida la concentración considerada óptima de cada anticuerpo, la cual se mantuvo para todos los estadios de progresión del cáncer.

4.2.3 Registro de las imágenes

Las imágenes de secciones teñidas con H&E y ácido peryódico de Schiff (PAS)/azul de alciano (AA) fueron registradas con un microscopio directo Olympus BX50, en modo luz transmitida. La observación y el registro de las señales de inmunofluorescencia fueron conducidos utilizando el mismo microscopio, pero en modo epifluorescencia. En los diferentes registros fueron utilizadas lentes objetivas de 20X, 40X y 100X. El aumento final en cada una de las figuras, fue indicado con una barra que representa la escala utilizada.

Las imágenes fueron registradas mediante una cámara CCD monocromática digital refrigerada Apogee (Andor, Concord, MA, USA) de 14 bits y procesadas secuencialmente para su presentación con los programas ImageJ y Gimp para eliminar señales de fondo. En el procesamiento con el *software* ImageJ, las imágenes fueron tratadas con el filtro UnsharpMask, pseudocoloreadas de acuerdo al fluoróforo y calibradas con la barra correspondiente. Las imágenes con las señales inmunofluorescentes fueron superpuestas con las imágenes teñidas con Hoescht 33342 correspondientes mediante el *software* Gimp 1, ambas registradas con distintas combinaciones de filtros. De este modo, tanto la señal inmunofluorescente como los núcleos celulares fueron compuestos en la misma imagen. Las imágenes fueron almacenadas en formato *tiff*. En cada caso fueron registrados los tiempos de exposición.

4.2.4 Análisis por microscopía óptica no lineal (MONL)

Los procesos de la óptica no lineal son aquellos que involucran más de un fotón. Éstos sólo ocurren si existe coincidencia temporal y espacial de múltiples fotones. La intensidad de un láser pulsado garantiza la coincidencia de los fotones en el tiempo, pero no en el espacio. La

concentración de los fotones en el espacio será mayor en el foco del láser (menor área del haz). Un proceso bifotónico cae con el inverso del área y uno de tres, con el inverso del cuadrado del área. Esto significa que los eventos no lineales sólo ocurren en las zonas de menor área, o sea aquellas ubicadas en el foco del láser, lo que los convierte en intrínsecamente confocales.

La microscopía bifotónica es un proceso resonante óptico no lineal de tercer orden en el que dos fotones excitan un electrón desde el estado fundamental. La absorción de dos fotones sólo ocurre cuando la energía de los fotones incidentes cae en la banda de excitación de dos fotones, que es específica para cada marcador fluorescente.

Por su eficiencia en la capacidad de excitación y de captura de la señal fluorescente, la microscopía multifotónica es una herramienta ideal para obtener imágenes en profundidad en los tejidos biológicos, característicos por sus elevados niveles de turbidez. Esta modalidad permite la excitación simultánea de diferentes fluoróforos a través de procesos de órdenes diferentes, con una misma longitud de onda. En esta modalidad las emisiones están espectralmente desplazadas cientos de nanómetros, lo que impide la ocurrencia de interferencias en su registro. Por otro lado, existen modalidades de microscopía no lineal, como la Generación del Segundo Armónico (SHG), que producen contraste, en función de la organización y orientación de las nanoestructuras presentes en la muestra. Éste, es un proceso óptico no lineal elástico coherente de segundo orden. Debido a que un par de fotones generan otro que duplica la energía de los incidentes, sin liberación de energía al medio, el daño celular resulta muy reducido o nulo. La señal de SHG puede ser aislada de la de fluorescencia por la longitud de onda o incluso por barreras temporales, ya que los procesos coherentes son prácticamente instantáneos.

4.2.5 Obtención de imágenes y cuantificación de la señal SHG

Las imágenes de MONL fueron obtenidas a partir de secciones histológicas teñidas con H&E tanto de colon murino normal como patológico. Para las imágenes bidimensionales fueron utilizados cortes de 5 μm de espesor. Las imágenes de fluorescencia excitada por dos fotones (TPEF) fueron utilizadas para referenciar la mucosa epitelial, mientras que las de SHG fueron empleadas para analizar la distribución y composición de las fibras colágenas, indicadoras del grado de invasividad de los tumores.

Las evaluaciones para la cuantificación del grado de ordenamiento del colágeno fueron realizadas en regiones de interés (ROI) de 300x300 píxeles, seleccionadas sobre imágenes de cortes transversales tanto de los órganos normales como a las 4, 8, 16 y 20 semanas posteriores a la inducción del CCR. El procedimiento fue realizado utilizando el *software* ImageJ (v1.45, NIH). Para obtener la relación de aspecto (RA), fue empleada la Transformada Rápida de

Fourier (FFT) de dichos ROI, considerada un buen método para asignar un grado de organización a las estructuras presentes en las imágenes [200]. En ésta función matemática, los valores, del conjunto de arreglos de fibras alineadas, son más altos a lo largo de la dirección orthogonal a la dirección de las fibras y tienden a adquirir una forma elipsoidal. Si las fibras exhiben una disposición paralela regular, la elipse tiende a tornarse lineal (Figura 14 A). Por el contrario, si éstas se orientan aleatoriamente y en forma irregular (como ocurre en los procesos cancerosos), la trama de intensidades de la FFT correspondiente tenderá a poseer un perfil circular (Figura 14 B). La anisotropía de la imagen fue evaluada realizando un ajuste elíptico en las imágenes de la FFT, mediante el cálculo de la relación de aspecto (RA) (relación de los ejes de los diámetros menor/mayor). La muestra es considerada más anisotrópica, conforme la RA toma valores próximos a cero (0), mientras que es más isotrópica cuando la RA es cercana a uno (1). Este rango de puntuación fue el aplicado en las imágenes registradas en la submucosa colónica.

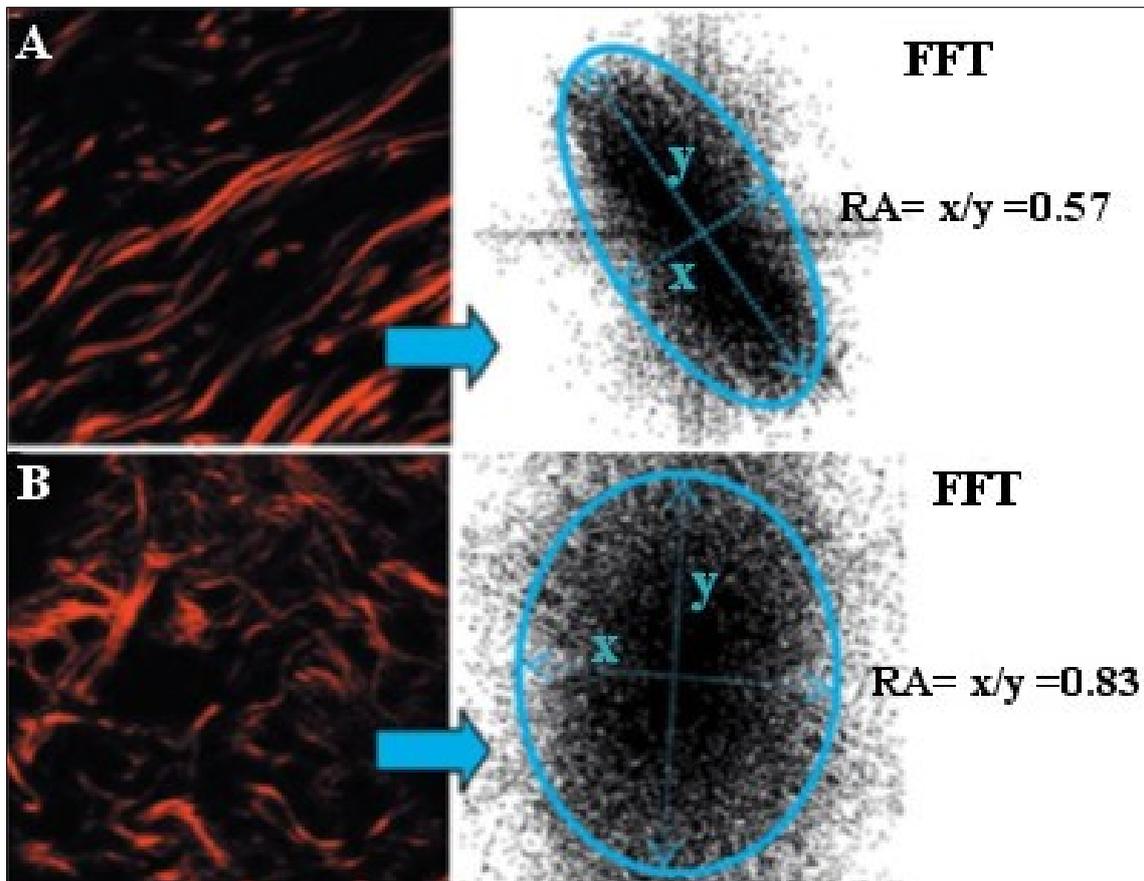


Figura 14. Representación de dos ordenamientos de fibras colágenas y las imágenes de la FFT que se obtienen a partir de los mismos. (A) Imagen de fibras paralelas a la izquierda y de su correspondiente FFT a la derecha, junto con el cálculo de la RA. (B) Fibras orientadas al azar a la izquierda y su imagen de FFT a la derecha, junto con el cálculo de la RA.

4.3 Análisis de la expresión génica de usando RT-*sq*PCR

4.3.1 Extracción del ARN

Los segmentos proximales y distales de colon fueron rotulados y conservados en N₂ líquido hasta su procesamiento. Todas las muestras fueron colocadas en tubos Eppendorf estériles y disgregadas mediante una tijera quirúrgica seguida de homogeneización utilizando un pilón de teflón, ambos previamente esterilizados y libres de ARNasas. Para la extracción y purificación del ARN fue utilizado el equipo *GeneJET RNA purification* (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, los pellets obtenidos fueron resuspendidos en 100 µl de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC), libre de nucleasas.

Para la determinación de la concentración de los ARN obtenidos de las distintas extracciones fueron medidas las absorbancias a 260 nm en suspensiones diluidas (1:300) y en todos los casos fue calculado el índice A260/280. La calidad de los ARN, fue determinada en geles de agarosa al 1,5%, analizando las bandas correspondientes a los ARN ribosomales.

4.3.2 Transcripción reversa

Para las retrotranscripciones fue utilizado el equipo para síntesis de ADNc RevertAid™ FirstStrand (Fermentas, Waltham, MA, USA), según las indicaciones del proveedor. Como cebadores para la retrotranscriptasa fueron utilizados oligonucleotidos poli-dT, para los ARNm correspondientes.

Para evaluar la transcriptasa reversa se realizaron tres controles, de acuerdo a los procedimientos y reactivos provistos en el *kit*:

- Control negativo de la transcriptasa reversa minus, se realizó para evaluar la contaminación de la muestra de ARN con ADN genómico. Este control se realizó colocando todos los reactivos de la transcripción reversa, excepto la enzima.
- Control negativo sin templado, se realizó para evaluar la contaminación de los reactivos. Se colocaron todos los reactivos para la transcripción reversa excepto el ARN.
- Control positivo, el *kit* provee ARN producido por transcripción *in vitro*. Se realizó la transcripción reversa reemplazando el ARN extraído por el ARN de GAPDH que provee el *kit*.

Posteriormente los controles fueron amplificados en una PCR con los primers para GAPDH que provee el *kit*.

4.3.3 Cebadores y amplificación

La selección de los cebadores fue realizada estimando su temperatura de fusión. Para cada uno de los genes bajo estudio, fueron elegidas secuencias con al menos un intrón intercalado, para evitar la detección y amplificación de ADN genómico contaminante. El diseño de los cebadores fue realizado teniendo en cuenta las siguientes premisas: longitud en el rango de 15 a 30 pb conteniendo una proporción de los nucleótidos G+C del orden del 50%.

Los oligonucleótidos de los cebadores específicos para cada uno de los genes evaluados en el presente trabajo se resumen en la Tabla 4, indicando sus secuencias, sus longitudes y los tamaños de los productos esperados.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados.

Gen	Cebadores	Secuencia	Longitud (pb)	Producto de PCR (pb)
ET-2	Directo	5'-CTGCGTTTTCGTCGATGCT-3'	19	422
	Reverso	5'-TGCAGCTCATGGTGTATCTCTTC-3'	24	
ET-1	Directo	5'-TTCCCGTGATCTTCTCTGCT-3'	22	370
	Reverso	5'-CCTGCTTGGCAGAAATCCA-3'	20	
ET _A	Directo	5'-GCTGGTCCCTCTTCACTTAAGC-3'	23	129
	Reverso	5'-TCATGGTTGCCAGGTTAATGC-3'	21	
ET _B	Directo	5'-TGTGCTCTAAGTATTGACAGATATCGAG-3'	28	240
	Reverso	5'-GGCTGTCTTGAAAAGTGCATGA-3'	23	
ANP	Directo	5'-GCCGGTAGAAGATGAGGTCA-3'	20	269
	Reverso	5'-GGGCTCCAATCCTGTCAATC-3'	20	
CNP	Directo	5'-CAACGCGCGCAAATACAAAG-3'	20	207
	Reverso	5'-AAAGCCACATTGCGTTGGAG-3'	20	
B2M	Directo	5'-CCGCCTCACATTGAAATCCAAATG-3'	24	579
	Reverso	5'-CACAGTGACAGACTTCAATTAGGC-3'	24	

Las amplificaciones fueron realizadas en *master mixes* de los siguientes reactivos (agregados en el orden indicado): *buffer* de reacción 10X (5 µl), dNTP 2 mM (5 µl) c/u, cebadores directo 10 µM (1 µl) y reverso 10 µM (1 µl), TaqADN polimerasa recombinante (Fermentas, Waltham, MA, USA) (0,25 µl), cloruro de magnesio 25 mM (4 µl) y ADNc (4 µl). Todas las reacciones fueron realizadas a volúmenes finales 50 µl adicionando agua libre de nucleasas. Como control interno de cada reacción fue utilizado el gen de la β-2 microglobulina (B2M) en función de su probada estabilidad durante el desarrollo del cáncer [201], [202]. Las reacciones multiplexadas fueron realizadas en tres subconjuntos, optimizando las condiciones de reacción. En la primera fueron empleados los cebadores para ET-1, ET-2 y B2M, en la segunda los cebadores para ET_A, ET_B y B2M y en la tercera, utilizando los cebadores de ANP, CNP y B2M.

Al mismo tiempo que las muestras, se prepararon los controles positivos y negativos. El control positivo se realizó reemplazando el ADNc de las muestras por el de la GAPDH sobrante del

control positivo de la transcripción reversa. El control negativo se realizó utilizando agua DEPC en lugar de ADNc.

Las amplificaciones fueron realizadas en el termociclador Ivema T-18 (Ivelma Desarrollos SRL, Llavallol, Bs As., Argentina) siguiendo el programa que se resume en la tabla 5. Las reacciones fueron resueltas en geles de agarosa al 3% con bromuro de etidio como agente intercalante y posteriormente visualizadas y registradas en el transiluminador UV Spectroline (Spectronics Corporation, Westbury, NY, EEUU).

Los productos obtenidos fueron identificados por su tamaño (en pares de bases), comparando los mismos con los calculados previamente. Para esto se utilizó un marcador de peso molecular comercial (Ladder de 50pb de PB-L Productos BioLógicos, Buenos Aires, Argentina).

Tabla 5. Programa de PCR empleado.

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	1.Desnaturalización inicial	3 min	95°C
35	2.1 Desnaturalización	35 s	95°C
	2.2 <i>Annealing</i>	1 min	58°C
	2.3 Extensión	35 s	72°C
1	3. Extensión final	1 min	72°C

4.3.4 Cuantificación

El registro de los geles fue realizado mediante un dispositivo de cámara oscura provisto de una cámara digital montada sobre el transiluminador. Para la cuantificación de las bandas de los geles, las imágenes digitalizadas fueron analizadas con el *software* ImageJ. Sobre cada imagen del gel fue demarcada la primera calle mediante un rectángulo, incluyendo las bandas que se encontraban en la misma. Posteriormente en la opción del menú “*Analyze*”, fue seleccionado el submenú “*Gels*” y la herramienta “*SelectFirstLane*”. A continuación el rectángulo fue desplazado a la siguiente calle y allí fue seleccionada la opción “*SelectNextLane*”, del mismo submenú. Este procedimiento fue aplicado sucesivamente con todas las calles analizadas. Posteriormente y siempre en el mismo submenú fue aplicada la función “*Plotlanes*”, obteniéndose un perfil gráfico que representa la densidad relativa de las bandas contenidas en el rectángulo sobre cada calle. Para cada pico fue delimitada el área bajo la curva y mediante la herramienta “*wand*” fueron calculados los valores de cada medición y referenciados con los obtenidos del control interno.

4.4 Análisis estadístico

Todos los valores presentados en este trabajo fueron expresados como la media \pm el error estándar medio. En los estudios de cuantificación de la expresión génica de los diferentes genes estudiados se analizó la normalidad y homocedasticidad de los datos. Posteriormente, en el caso

de que se cumplieran los postulados de normalidad, se aplicó el test paramétrico t de student, mientras que cuando los mismos fueron rechazados se aplicó el test no paramétrico U de Mann-Whitney, para las columnas seleccionadas. Para las cuantificaciones del grado de ordenamiento del colágeno fue utilizado el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis con un test de Dunn de comparación. En todos los casos las diferencias menores a 0,05 fueron consideradas estadísticamente significativas y las menores a 0,01 muy significativas.

Todos los datos fueron procesados y analizados con el programa estadístico SPSS 2016, versión 23 (IBM, Armonk, NY, USA). Los gráficos fueron realizados empleando el programa SigmaPlot 2001, versión 7.0 (SSI, Richmond, California, USA).

5. Resultados

La presentación de los resultados ha sido dividida en dos secciones principales, la primera describe el análisis del comportamiento del sistema de endotelinas en los animales normales mientras que en la segunda se presenta lo que ocurre en el modelo de inducción de CCR. Esta última se subdivide a su vez en cuatro subsecciones en las que se presentan las características de la progresión de la patología en el colon en los estadios estudiados: la cuarta, la octava, la decimosexta y la vigésima semanas posteriores a la inducción del CCR.

En la primera sección se muestran los resultados de los estudios realizados utilizando dos tinciones histológicas, las técnicas de microscopía no lineal y la cuantificación de los transcritos de péptidos y receptores en colon proximal y distal de animales sin tratar, con el objetivo de caracterizar los tejidos normales. En la segunda sección, se muestra al inicio el desarrollo del modelo de inducción del cáncer colorrectal y a continuación, los resultados de todas las técnicas utilizadas centradas en colon distal, debido a que en este modelo de inducción, los tumores se desarrollan en este segmento. Por este motivo, excepto los estudios de RT-*sq*PCR, los restantes basados en imágenes (H&E, PAS/AA, IF, SHG, TPEF) se llevaron a cabo exclusivamente en dicho segmento.

5.1 Animales normales

5.1.1 Análisis histológico

En ratones normales la superficie de la mucosa colónica exhibe una estructura plana con criptas separadas por el estroma. Estos animales muestran el típico epitelio columnar superficial intacto, sin erosiones, con células caliciformes que exhiben el típico contenido de mucina. Las criptas se visualizan como estructuras individuales, no ramificadas, que se extienden hasta la capa muscular de la mucosa. A través de todo el espesor de la lámina propia, pueden observarse linfocitos aislados o agregados formando acúmulos o folículos linfoides (Figura 15 A). Como puede observarse en la Figura 15 A, estas estructuras se localizan tanto en la mucosa como en la submucosa. El epitelio asociado a los folículos linfoides exhibe, característicamente, menor número de células caliciformes y su citoplasma frecuentemente muestra deformaciones debidas a la presencia de los linfocitos adyacentes. En la Figura 15 B se muestran células del plexo mientérico, el cual se localiza entre las capas circular y longitudinal de la muscular propia.

En ratones normales, la tinción histoquímica de PAS/AA permite evidenciar la existencia de mucopolisacáridos neutros (PAS+) y ácidos (AA+). A lo largo del colon normal, ambos tipos de mucopolisacáridos coexisten, pero los neutros predominan en el colon ascendente mientras que los ácidos son más abundantes en el descendente y el recto (Figura 15 D).

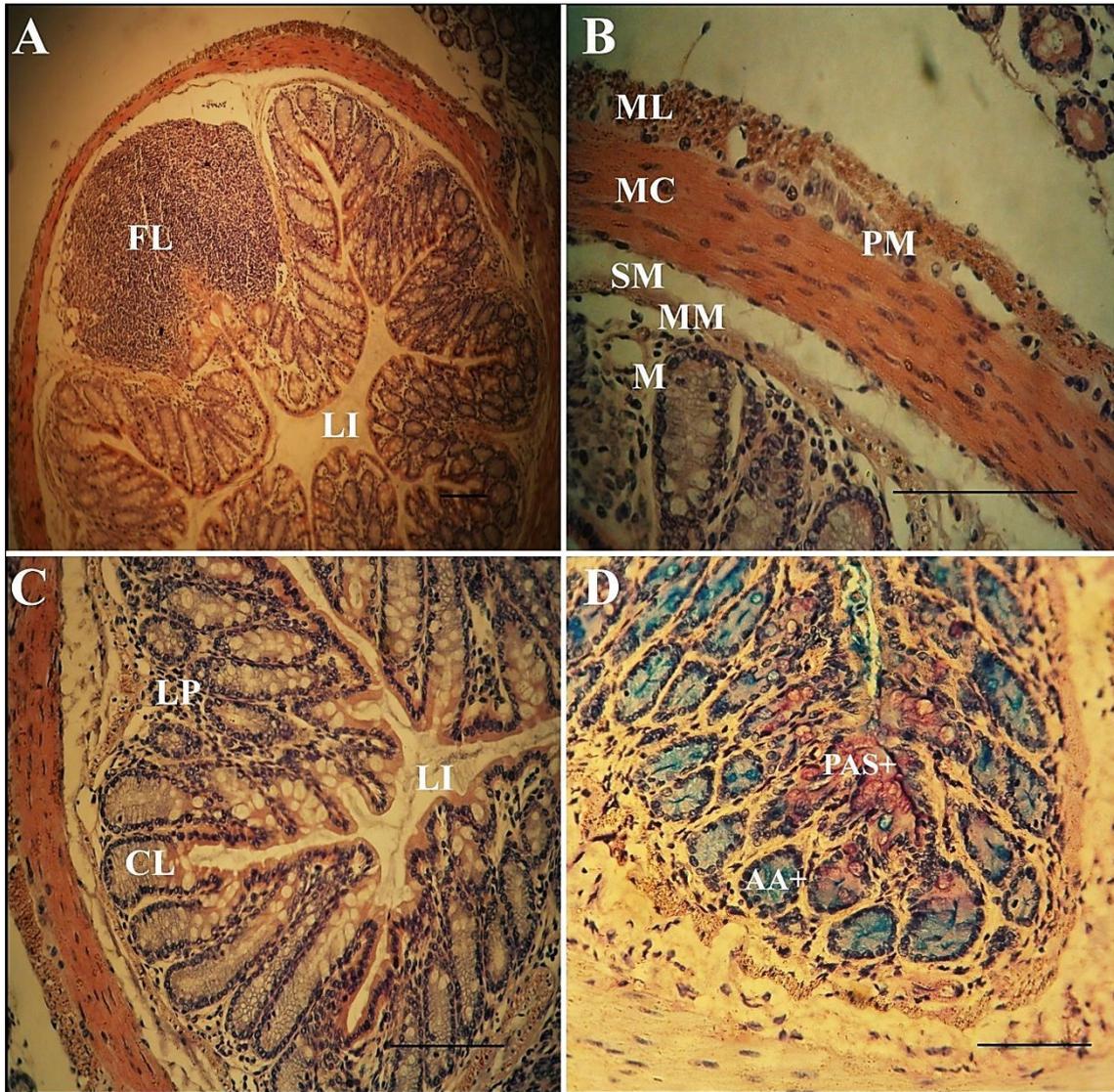


Figura 15. Detalle de secciones histológicas transversales teñidas con H&E (A, B y C) y PAS/AA (D) del colon de animales normales. (A) Se observa la estructura del colon a baja magnificación en el que se identifica la luz del intestino (LI) y un folículo linfático (FL). (B) En esta sección se observan las sucesivas capas que conforman la estructura del órgano: la muscular longitudinal (ML), la muscular circular (MC) y entre ambas el plexo mientérico (PM), avanzando hacia la luz intestinal se encuentra la submucosa (SM), la muscular de la mucosa (MM) y finalmente la mucosa (M). (C) En esta imagen se observan las criptas de Lieberkühn (C) y la lámina propia (LP), que conforman la capa mucosa que reviste el intestino. (D) Se observan mucopolisacáridos ácidos (AA+) y neutros (PAS+) en la mucosa del colon. Barras=50µm.

5.1.2 Análisis bidimensional cualitativo y cuantitativo del colágeno por MONL

Las secciones transversales del colon teñidas con H&E fueron posteriormente analizadas empleando técnicas de MONL. Como se ha descrito precedentemente, la SHG permite la visualización de estructuras anisotrópicas como las fibras de colágeno. En la Figura 16, se muestran las imágenes de TPEF y de SHG en las que se pueden visualizar tanto la capa mucosa como la submucosa, separadas por la muscular de la mucosa (línea punteada). En las imágenes representativas del tejido normal, la distribución de las fibras colágenas se visualiza claramente

mediante la técnica de SHG. Éstas se localizan principalmente en la submucosa, siendo escasas en la mucosa. La observación de la submucosa permite la determinación cualitativa de las modificaciones en la cantidad de las fibras de colágeno y adicionalmente posibilita la caracterización de su organización.

Para cuantificar los valores que permiten determinar las orientaciones preponderantes de las fibras colágenas, se evaluó su arreglo (ordenamiento) en la submucosa tanto en colon de animales normales, como en los cuatro estadios de CCR analizados.

Sobre las imágenes de SHG (Figura 16), se seleccionaron tres ROI de 300x300 píxeles, en los cuales se calcularon y promediaron los valores de la relación de aspecto (RA) de la elipse que mejor se adapta a la imagen de la función matemática Transformada Rápida de Fourier (FFT).

El cálculo de los valores promedio de la RA de las FFTs en los ROI, permitió establecer la RA de los animales normales (control). Dichos valores son del orden de $0,53 \pm 0,08$ (n=5). Este valor es utilizado para la comparación con los respectivos valores de RA obtenidos de imágenes de SHG durante la progresión de la patología.

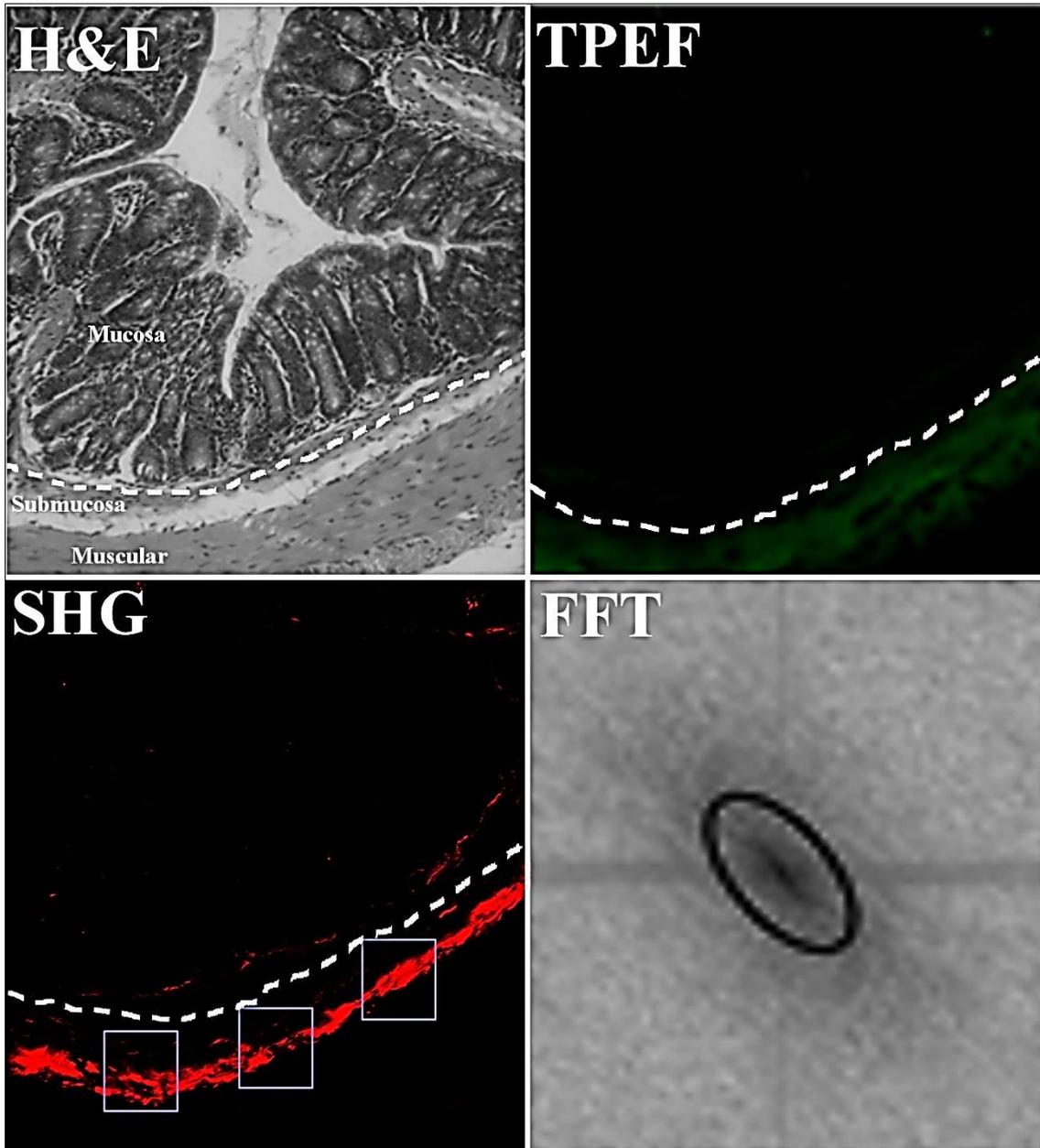


Figura 16. Imágenes de H&E, TPEF y SHG de un corte transversal de colon distal normal de ratón. En las imágenes se observan las capas: mucosa y submucosa, separadas por la muscular de la mucosa (línea punteada). También, a modo descriptivo, se muestra una imagen de la FFT de uno de los ROI y su ajuste elíptico.

5.1.3 Análisis de la expresión génica de las ET

Una vez que se completó la caracterización morfológica del colon murino normal, se evaluaron los niveles de expresión génica de los péptidos y receptores del sistema de endotelinas utilizando la técnica de RT-*sq*PCR. En estos estudios, se verificó que las endotelinas y sus receptores se expresan tanto en el colon proximal como en el distal.

La expresión génica de cada uno de los genes del sistema de las endotelinas estudiados se resume en la Figura 17. La expresión de ARNm para ET-2 muestra que, en colon proximal de

ratones normales, los niveles son del orden de 0,07 veces en relación a los verificados para el gen constitutivo correspondiente (B2M), mientras que descienden a 0,01 veces en colon distal. Cuando se compara la expresión en los dos segmentos analizados, el colon proximal exhibe valores significativamente superiores a los verificados en el colon distal ($p < 0,05$). Por el contrario, la expresión génica de ET-1, en relación con el gen constitutivo, alcanza valores del rango de 0,08 a 0,42 veces. Inversamente a lo registrado para ET-2, los niveles de expresión génica resultan muy superiores en colon distal en comparación con los verificados en el colon proximal ($p < 0,01$).

En relación con el receptor ET_A, los niveles de expresión resultaron muy bajos, del orden de 0,01-0,03 veces, respecto del gen constitutivo B2M. En este caso no se verificaron diferencias significativas en las dos regiones del colon estudiadas. En el caso del receptor ET_B, los niveles respecto del gen B2M fueron del orden de 0,14 y 0,15 veces. En este caso, tampoco se verificaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica del receptor, entre ambos segmentos del colon.

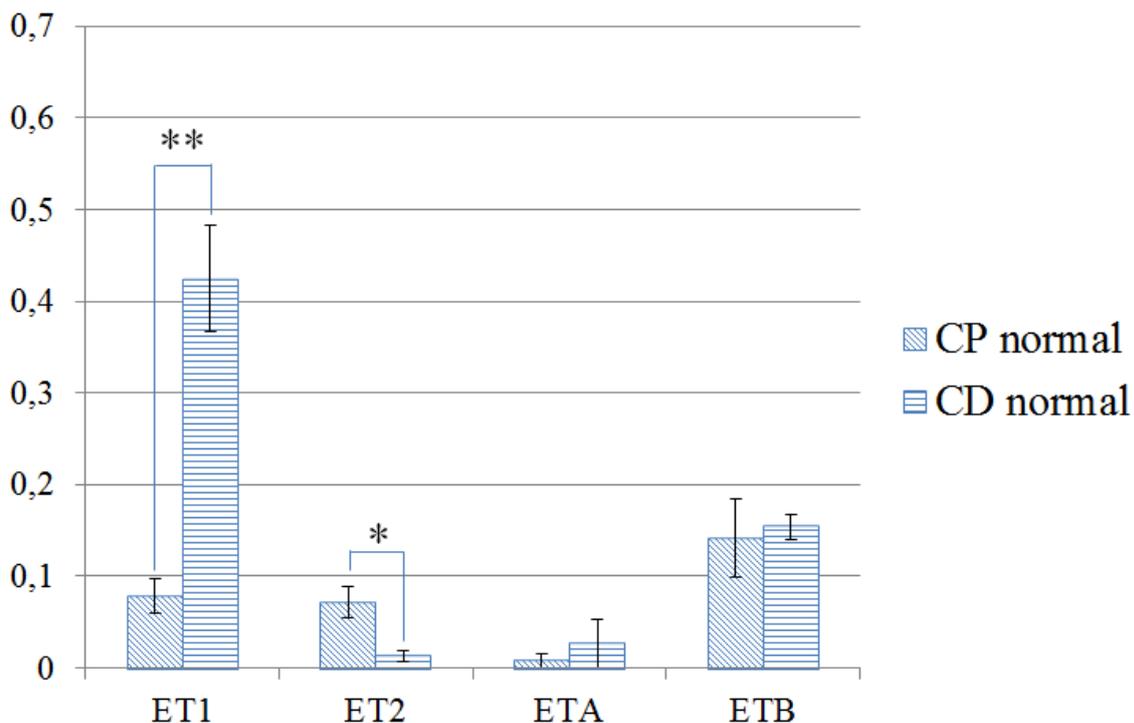


Figura 17. Niveles de expresión génica de ET-1, ET-2, ET_A y ET_B relativa al gen constitutivo B2M. Se observa la expresión diferencial de estos cuatro genes tanto en el colon proximal como en el distal de ratones normales. (* $p < 0,05$ diferencias estadísticamente significativas; ** $p < 0,01$ diferencias estadísticamente muy significativas) $X \pm SEM$, (n=5).

5.1.4 Análisis de inmunolocalización de las ET

El análisis de la distribución del péptido ET-1 muestra que esta molécula exhibe una amplia distribución en distintos tejidos del colon, tanto en el segmento proximal como en el distal

(Figura 18). La inmunomarcación se localiza en la capa mucosa, tanto en las criptas de Lieberkühn, como en el estroma (lámina propia). En la capa mucosa, asume una distribución fundamentalmente citoplasmática, aunque en algunas zonas también se verifica una localización nuclear (Figura 18, colon distal). En el estroma, la señal se ubica principalmente en la membrana basal que recubre las criptas, fundamentalmente en los fibroblastos subepiteliales, así como en las células linfoides. En la submucosa la ET-1 se localiza en vasos sanguíneos. También se observó marcación de ET-1 en la muscular de la mucosa, la muscular propia y el plexo mientérico (no mostrado). En todos los casos la marcación es principalmente citoplasmática.

En la mucosa del colon murino normal, ET-2 se localiza principalmente en las células columnares de las criptas de Lieberkühn. En el colon proximal, la inmunomarcación no muestra un patrón regular, pudiendo observarse mayoritariamente en la base de las criptas (tercio inferior), aunque en algunos casos se verificó una señal homogénea a lo largo del eje de la cripta (Figura 18, colon proximal) y en otras secciones, en la región superior de las criptas colónicas (tercio superior). Por el contrario, en el colon distal, la inmunomarcación se localizó exclusivamente en el tercio inferior (Figura 18, colon distal). En algunas secciones se observaron también células inmunes marcadas. En el caso de ET-2, la marcación es exclusivamente citoplasmática.

En relación con la inmulocalización de los receptores, ET_A se localiza tanto en colon proximal como en el distal, en el citoplasma de las células de las criptas de Lieberkühn, principalmente en el tercio inferior de las mismas (Figura 19). En colon proximal se visualizan dos patrones de marcación, una citoplasmática (aparentemente localizada en vesículas secretoras), y la otra en el borde apical de las células columnares (flechas). En colon distal, se observa principalmente marcación citoplasmática, aunque en algunos casos se pudo verificar marcación nuclear (no mostrado). También se verifica inmunomarcación en células subepiteliales y en algunas células linfoides, en los vasos sanguíneos y en algunas secciones, en la capa muscular y el plexo mientérico (no mostrado).

La localización del receptor ET_B se verifica en algunos casos en el citoplasma celular (Figura 19, colon proximal), aunque en la mayoría de las secciones se encuentra casi exclusivamente en los núcleos de las células de la mucosa, tanto en colon proximal como en el distal (Figura 19). También se pudo observar señal inmunofluorescente, en algunos núcleos de linfocitos y de células musculares (no mostrado).

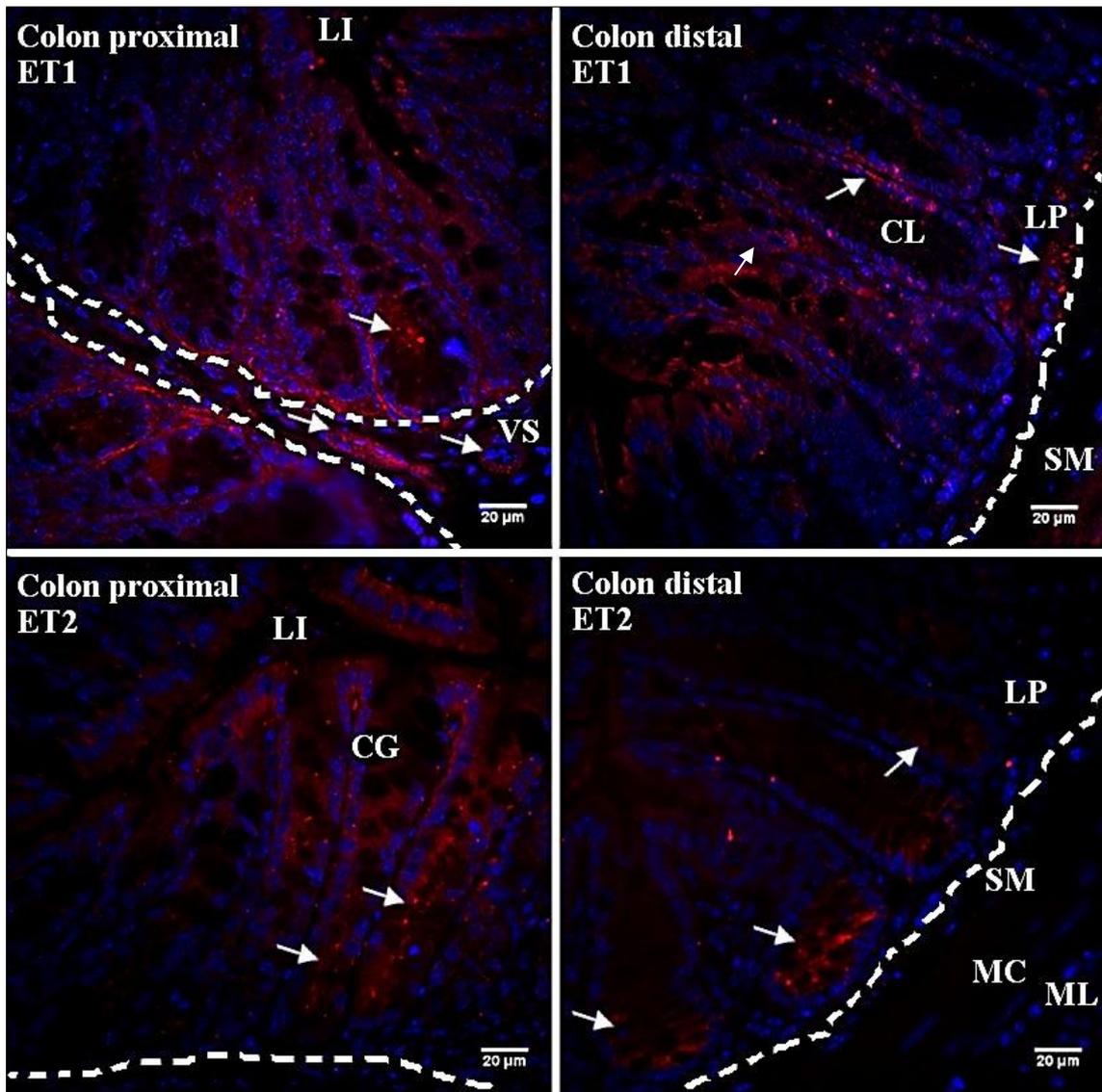


Figura 18. Imágenes representativas de la inmunolocalización de ET-1 y ET-2 en colon normal de ratón, en los segmentos proximal y distal. Se observa marcación de ET-1 en una amplia variedad celular y tisular, tanto en colon proximal como distal (flechas). Con respecto a la marcación de ET-2, ésta se localizó principalmente en la mucosa, en las células columnares (flechas), siendo en este caso homogénea a lo largo de la cripta de Lieberkühn en colon proximal y sectorizada (se observa en el tercio inferior de las criptas), en colon distal. Línea punteada: muscular de la mucosa; LI: luz intestinal; VS: vaso sanguíneo; CL: cripta de Lieberkühn; LP: lámina propia; SM: submucosa; CG: célula goblet, MC: muscular circular; ML: muscular longitudinal.

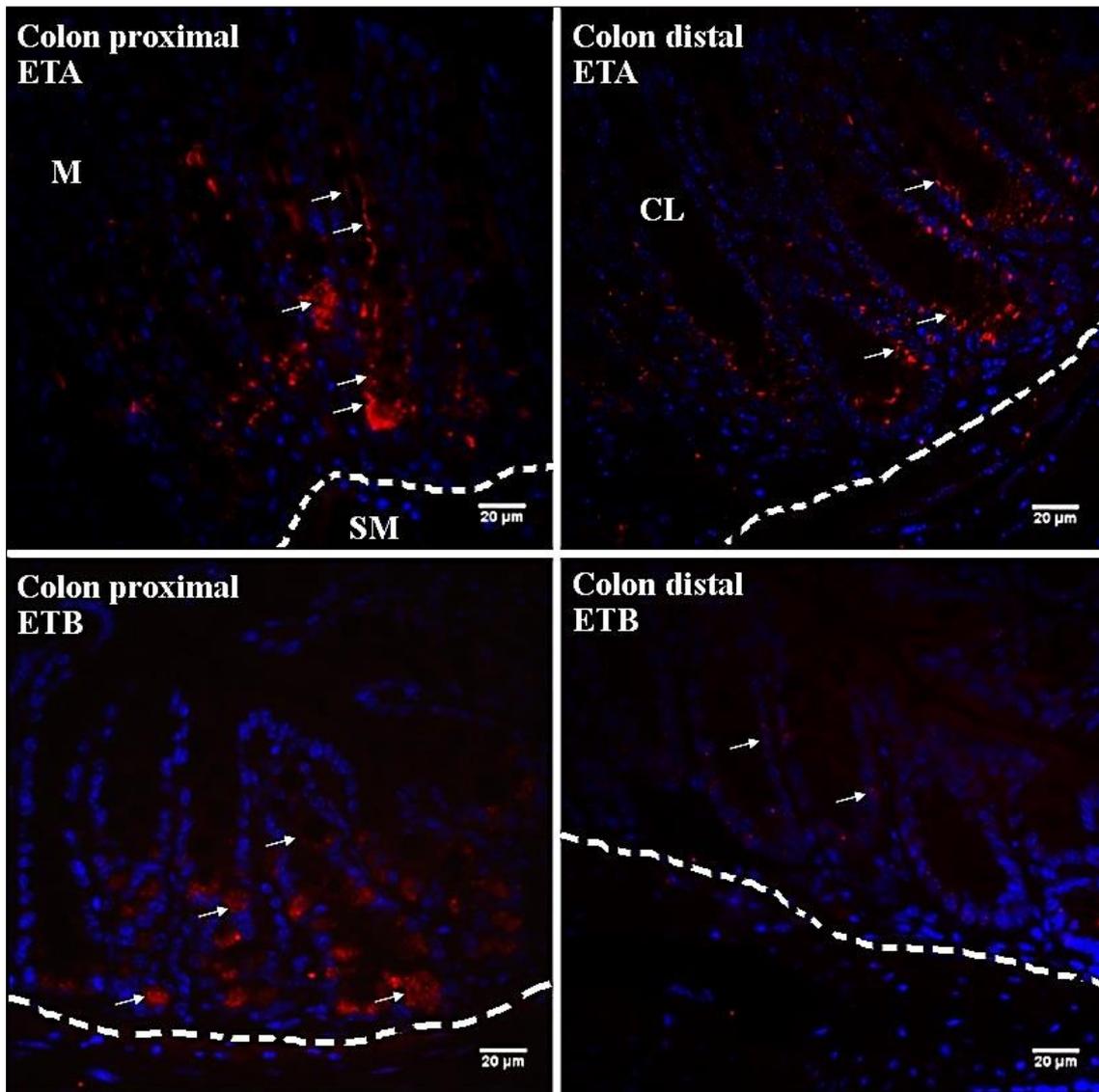


Figura 19. Imágenes representativas de la inmunolocalización de los receptores ET_A y ET_B en colon normal de ratón, en los segmentos proximal y distal. Se observa inmunomarcación de ET_A principalmente en las células columnares de las criptas de Lieberkühn, en citoplasma y en el borde apical. La inmunomarcación de ET_B se observa también en citoplasma y en núcleos de células epiteliales en colon proximal, y exclusivamente en núcleos en colon distal. Línea punteada: muscular de la mucosa; M: mucosa; SM: submucosa; CL: cripta de Lieberkühn.

En la Figura 20 pueden observarse las reacciones tanto en colon proximal como en el distal en las que se omitió el anticuerpo primario, en las que no se observaron marcaciones inespecíficas.

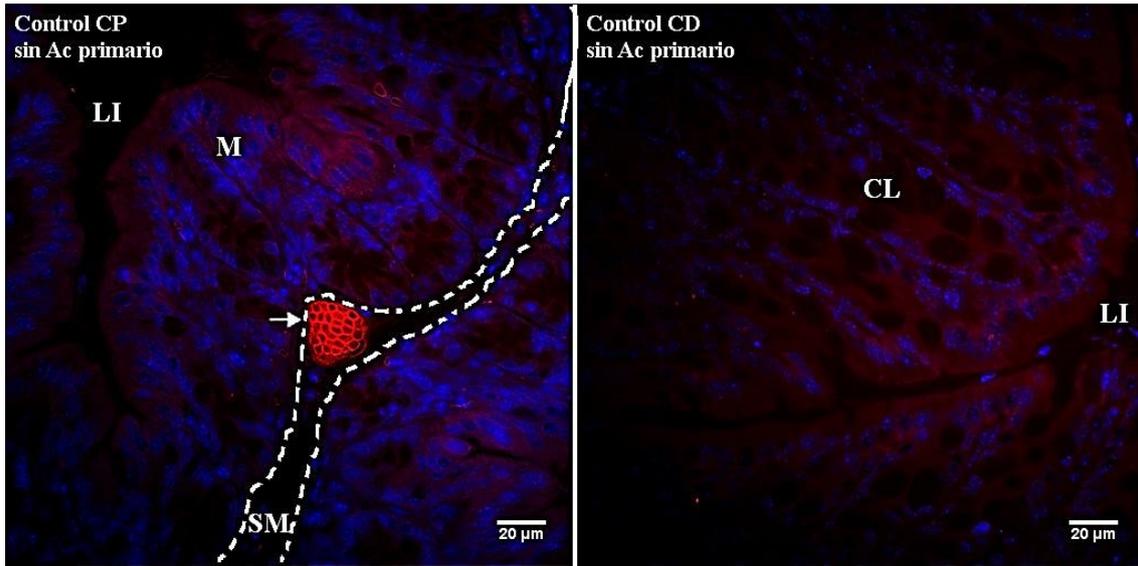


Figura 20. Imágenes representativas de la reacción de inmunofluorescencia omitiendo el anticuerpo primario en colon proximal (CP) y colon distal (CD). Se observa solamente autofluorescencia de glóbulos rojos en un capilar sanguíneo (flecha). Línea punteada: muscular de la mucosa; M: mucosa; SM: submucosa; LI: luz intestinal; CL: cripta de Lieberkühn.

5.1.5 Análisis de expresión génica e inmunolocalización de los péptidos natriuréticos

Complementando los hallazgos del sistema de endotelinas, se realizó un análisis semejante, combinando estudios de expresión génica y de inmunolocalización de un grupo antagónico de moléculas vasoactivas, los péptidos natriuréticos ANP y CNP.

En el caso de ANP se verificó que en relación al gen de referencia (B2M), este exhibe bajos niveles de expresión tanto en el colon proximal como en el distal (0,09 y 0,12 veces respectivamente), sin embargo no hay diferencias significativas entre ambos segmentos estudiados. Algo semejante se verifica para CNP, el que exhibe valores de 0,08 y 0,11 veces respecto del gen constitutivo, en el colon proximal y distal respectivamente. Como se observó para ANP, CNP tampoco muestra diferencias significativas entre ambos segmentos estudiados en el colon de ratones normales (Figura 21).

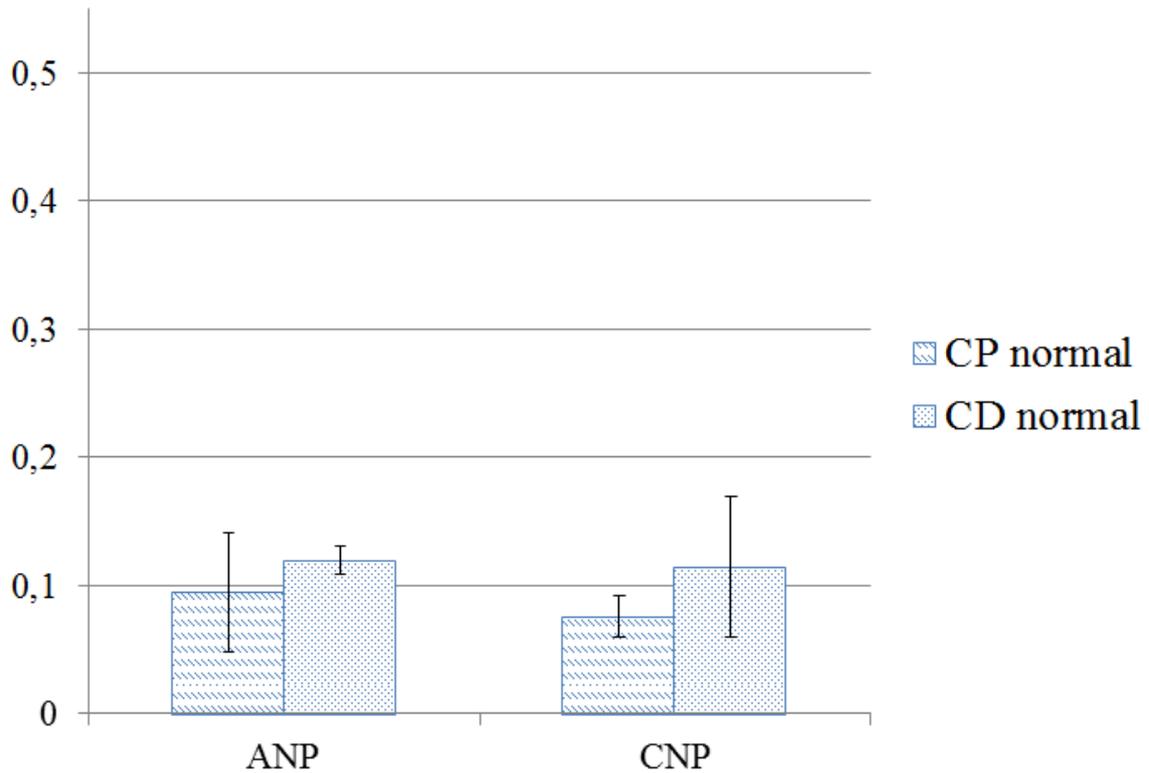


Figura 21. Expresión génica de los péptidos natriuréticos ANP y CNP relativa al gen B2M en colon proximal y distal de ratones. Se observa que la expresión de ANP y la de CNP no presentan un patrón diferencial en los distintos segmentos del colon normal. $X \pm SEM$, ($n=3$).

En relación con los estudios de inmunofluorescencia, como puede visualizarse en la Figura 22, el ANP se localiza fundamentalmente en el citoplasma del tejido mucoso, aunque también se observa marcación IF nuclear en tejido submucoso y muscular (no mostrado). En algunas secciones, se observa además marcación en células linfoides. Por otro lado, en el epitelio del colon distal la principal localización celular del péptido ANP fue nuclear. También se encontró reacción en citoplasma y núcleos de células de la lámina propia (Figura 22, colon distal).

En el caso de CNP, este péptido se localiza principalmente en el tejido mucoso, aunque también se observó una débil inmunoseñal en la capa muscular de la mucosa. En el colon proximal la localización celular es principalmente citoplasmática y se ubica hacia la región apical de las células columnares de las criptas de Lieberkühn. En colon distal, la inmunomarcación es principalmente de localización nuclear y claramente sectorizada hacia el tercio superior de las criptas de Lieberkühn (Figura 22, colon distal).

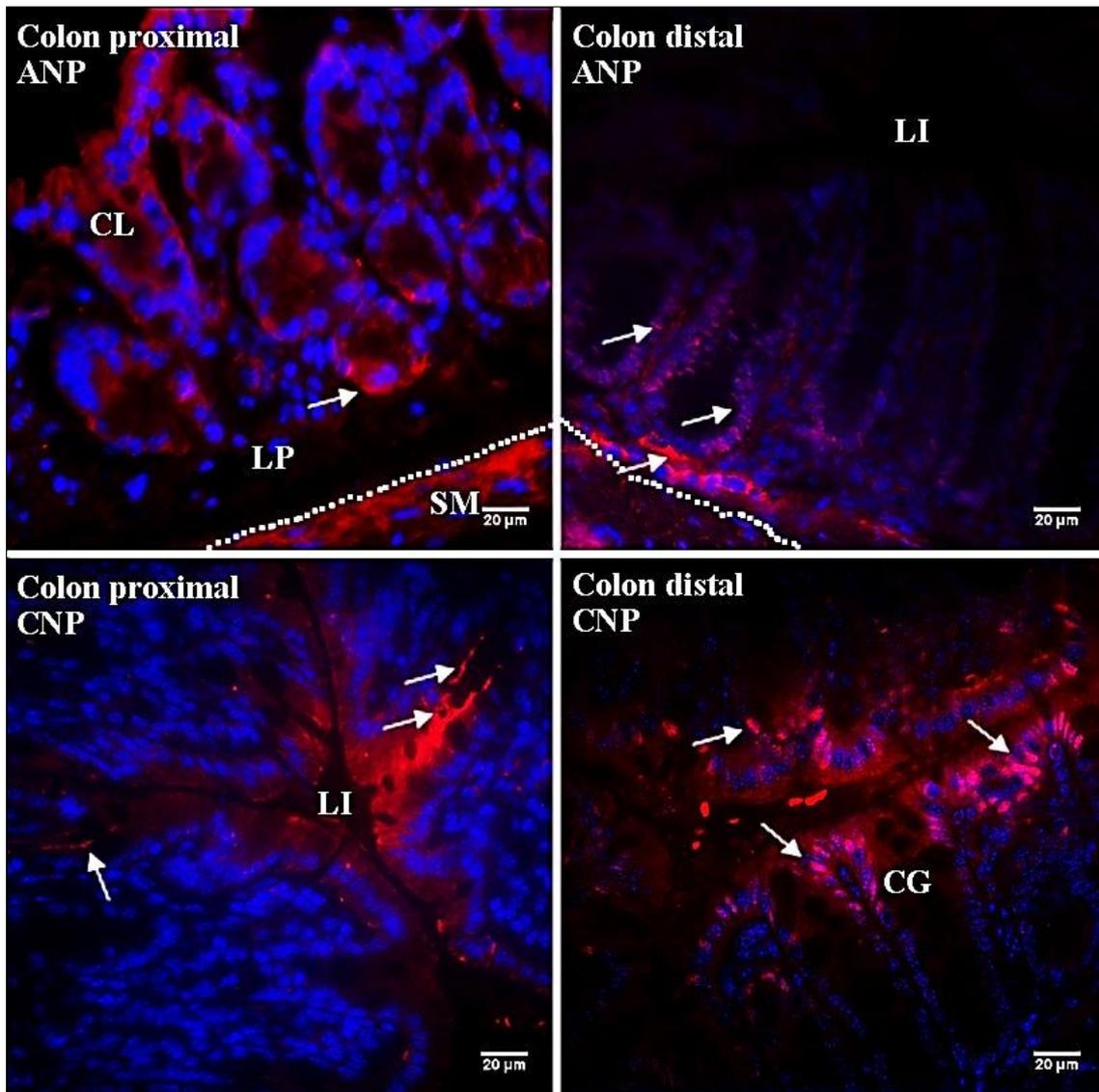


Figura 22. Imágenes representativas de la inmunolocalización de los péptidos natriuréticos ANP y CNP en colon proximal y colon distal de ratones normales. La marcación de ANP es difusa y más bien citoplasmática en colon proximal, mientras que en colon distal se ubica fundamentalmente en los núcleos del epitelio. Se observa una localización claramente sectorizada de CNP hacia el borde apical de las células columnares de las criptas de Lieberkühn en colon proximal, y en los núcleos del tercio superior de las mismas en el colon distal. Línea punteada: muscular de la mucosa; SM: submucosa; CL: cripta de Lieberkühn; LP: lámina propia; LI: luz intestinal; CG: célula goblet.

Resumiendo los hallazgos de la caracterización de los perfiles de expresión de péptidos vasoactivos en el colon normal murino, en una primera etapa se realizó el análisis histológico y se cuantificó el grado de organización de la matriz de las fibras colágenas. Los principales hallazgos en relación a la expresión génica de las ET fueron que la ET-1 se expresa principalmente en colon distal mientras que la ET-2 lo hace en colon proximal. Además, el principal receptor expresado en tejido sano es el ET_B, mostrando el ET_A bajos niveles de expresión. Los principales sitios de inmunolocalización de endotelinas y péptidos natriuréticos en colon distal se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 6. Se resumen las principales localizaciones de los péptidos vasoactivos y receptores en el colon murino normal

Péptidos y receptores	Localización tisular
ET-1	Capas mucosa, submucosa y muscular. Adicionalmente se verifica también en plexo mientérico y vasos sanguíneos. La localización es principalmente citoplasmica.
ET-2	Restringida a la capa mucosa, principalmente en las células columnares del tercio inferior de las criptas de Lieberkühn. Localización citoplasmica.
ET _A	Capas mucosa submucosa y muscular. En la mucosa restringidos al tercio inferior de las criptas de Lieberkühn. También se verificó marcación en el plexo mientérico y los vasos sanguíneos. Localización citoplasmica.
ET _B	Principalmente en mucosa. Localización nuclear.
ANP	Principalmente en mucosa, en el tercio inferior de las criptas de Lieberkühn, localización nuclear. En las células de la lámina propia, la marcación posee distribución tanto citoplasmática como nuclear.
CNP	Principalmente en la capa mucosa. Localización nuclear y claramente sectorizada en el tercio superior de las criptas de Lieberkühn.

5.2 Modelo de inducción del CCR con AOM/SSD

El modelo de inducción de CCR utilizando AOM/SSD se desarrolló de acuerdo a lo descrito en la sección materiales y métodos. La inyección de AOM se consideró como día inicial del experimento. A los pocos días de iniciado el tratamiento con SSD (semana 2), todos los ratones mostraron indicios de inflamación intestinal, entre los que se pueden destacar la presencia de diarrea y sangrado anal. Estos síntomas persistieron aproximadamente durante la semana posterior al tratamiento con SSD. Transcurrida la tercera semana, los ratones en general remitieron sus síntomas, aunque en algunos casos se observaron eventuales sangrados anales y prolapso rectal. En la Figura 23 se muestran imágenes macroscópicas de los intestinos gruesos extraídos tanto de los animales normales (control del experimento), como de los inducidos con AOM/SSD obtenidos a las semanas 4, 8, 16 y 20 posteriores a la inyección de AOM.

Hacia el extremo derecho de estas imágenes, puede observarse el ciego, el cual en roedores se encuentra muy desarrollado, mientras que en el extremo izquierdo se observan el recto y el ano. Éste último exhibe una notable dilatación debida al prolapso rectal que se evidencia conforme progresa la patología. A nivel macroscópico se verifica que durante las primeras 16 semanas, los tumores se desarrollan exclusivamente en el colon distal (*), sin embargo, la zona comprometida se extiende hacia el colon proximal y hacia el recto, en las últimas cuatro semanas del

experimento. Conforme se produjo el agravamiento del desarrollo tumoral, el colon sufre un engrosamiento progresivo, llegando a provocar obstrucciones en algunos de los animales inducidos.



Figura 23. Imágenes mostrando el aspecto de la región anal de ratones BALB/cMedc (a) normal (control) y (b) tratado con AOM/SSD finalizando la tercera semana de tratamiento, en el que se verifica la alteración de dicha región que es acompañada por procesos de diarrea y sangrado. (c) Imágenes macroscópicas del intestino grueso de ratones normales (superior) y tratados con AOM/SSD a las semanas cuarta, octava, decimosexta y vigésima del experimento (hacia abajo). Los asteriscos indican el final de colon proximal y el comienzo del distal, en los estadios de la progresión del CCR a las semanas octava, decimosexta y vigésima semana. En dichas imágenes se observa claramente el progresivo engrosamiento del diámetro del órgano debido al desarrollo de los tumores en las distintas regiones del colon.

5.2.1 Cuarta semana del tratamiento con AOM/SSD

5.2.1.1 Análisis histológico

En las secciones de las muestras de colon recolectadas en la cuarta semana posterior a la inducción del CCR (S4) se evidenció el desarrollo de un proceso inflamatorio en la totalidad de los animales tratados. En los preparados histológicos se observaron zonas con colitis ulcerativa activa, manifestada por la presencia de diferentes características asociadas a la patología. Las criptas de Lieberkühn muestran distorsiones tales como acortamiento, bifurcación y variaciones de su calibre. En algunos casos se verifica fusión de criptas, núcleos hipercromáticos con atipia inflamatoria y pérdida de células caliciformes. Este conjunto de alteraciones caracterizan el estadio denominado: focos de criptas aberrantes (FCA). También, se visualiza el incremento de la distancia entre las criptas y la muscular de la mucosa. En la lámina propia se observa un infiltrado inflamatorio difuso, con predominio de células polimorfonucleares (Figura 24A). Algunos animales presentaron displasia severa con desarrollo de adenocarcinomas *in situ*, mientras que otros presentaron displasias leves y cambios reactivos crípticos. Las lesiones son planas y se pueden clasificar como de tipo T0 en la escala TNM.

En los FCA displásicos se observa una disminución de células goblet y una variación en su contenido, rico en mucopolisacáridos ácidos (AA+) (Figura 24B). En las zonas adyacentes a

estas lesiones preneoplásicas también se evidencia el cambio de contenido de las células goblet, lo que se corresponde con el complejo rol protector del epitelio intestinal contra las injurias. Los cambios en la composición o en la cantidad de mucina secretada contribuirían a diversos procesos biológicos involucrados en el desarrollo y progresión del CCR.

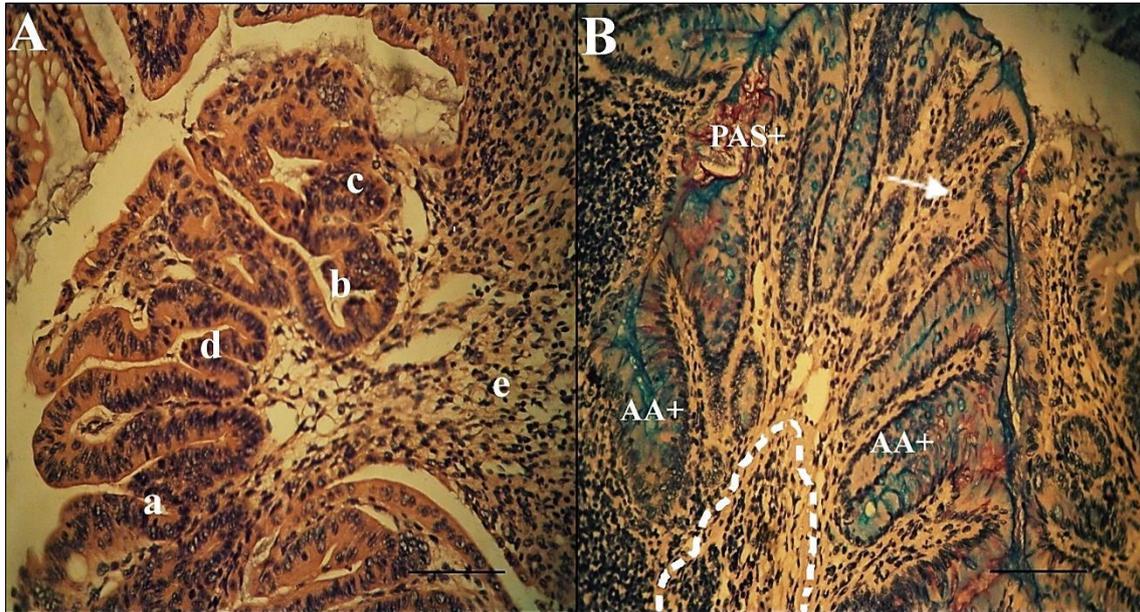


Figura 24. Imágenes representativas de cortes transversales del colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la cuarta semana del experimento. (A) Tinción de H&E, se observa un foco de criptas aberrantes que exhibe las siguientes alteraciones: (a) acortamiento de criptas, (b) bifurcación, (c) variaciones en el calibre y (d) fusión de criptas, también se observa en la mucosa una disminución en el número de células goblet y en el estroma un infiltrado linfocitario (e). (B) Tinción de PAS/AA, se observa un grupo de criptas con cambios reactivos (flecha), y en la zona adyacente de las mismas, se manifiesta un aumento en la producción de mucopolisacáridos AA+. La línea discontinua indica el límite de la mucosa y la muscular de la mucosa. Barra = 50µm.

5.2.1.2 Análisis bidimensional cualitativo y cuantitativo del colágeno por MONL

Como se indicó precedentemente, la microscopia de SHG permite resaltar, visualizar y cuantificar los cambios de las estructuras anisotrópicas, como las fibras de colágeno, en especímenes biológicos. En la Figura 25 se observa una sección de una región del tejido patológico del colon distal, obtenido en la S4. La imagen de H&E posibilita el reconocimiento estructural, la imagen de TPEF, obtenida simultáneamente y en la misma zona que la SHG, facilita la caracterización cualitativa del tejido y la imagen de SHG, permite identificar la distribución de las fibras de colágeno así como la cuantificación de los cambios relacionados con la reorganización de la matriz extracelular. Así, la observación de la submucosa permite determinar cualitativamente un incremento en la cantidad de las fibras colágenas. Adicionalmente, la cuantificación de su organización mediante el cálculo de la RA muestra que este estadio, exhibe diferencias muy significativas en relación con los valores obtenidos en este parámetro en los animales normales ($p < 0,01$) (Figura 25, FFT). El incremento promedio de 0,25

puntos de la RA, verificada en la S4 desde la inducción, permite corroborar cuantitativamente el aumento en el grado de desorganización de las fibras colágenas observadas cualitativamente.

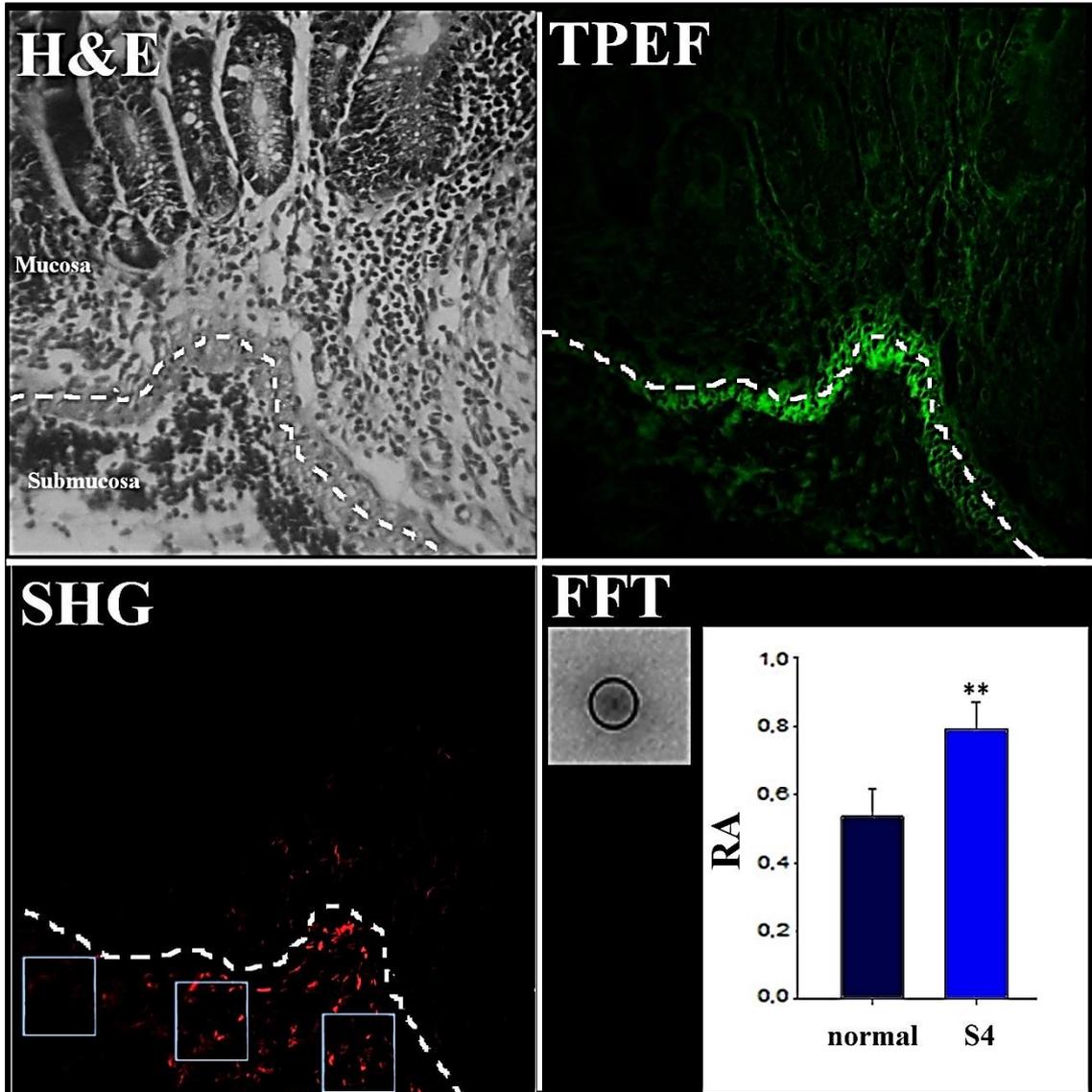


Figura 25. Imágenes representativas de H&E, TPEF y SHG de un corte transversal de colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la cuarta semana del experimento (S4). En las imágenes se observan las capas: mucosa y submucosa, separadas por la muscular de la mucosa (línea punteada). También se muestra una imagen de la FFT de uno de los ROI y su ajuste elíptico, junto con el gráfico de la RA de ratones control y tratados (S4) (n=5).

5.2.1.3 Análisis de la expresión génica del sistema de las ET a la S4 posinducción

Los resultados de la expresión génica del sistema de las endotelinas en ambos segmentos del colon, en la cuarta semana posterior a la inducción, se resumen en la Figura 26. En relación con la expresión génica de ET-1 en el colon proximal, a la cuarta semana de inducción, no se verifican cambios significativos respecto de los niveles observados en los animales normales (0,08 veces respecto al gen constitutivo B2M). Este péptido exhibe niveles significativamente

superiores ($p < 0,05$) del orden de 0,21 veces en el colon distal con respecto al colon proximal de los animales inducidos al desarrollo del CCR, aunque no alcanza los niveles encontrados en los animales normales. En este estadio, la expresión de ET-2 sólo pudo detectarse a nivel del colon proximal. En este caso, se observa una muy baja expresión en relación con el gen constitutivo B2M (0,07 veces). Dichos valores resultan semejantes a los verificados en los animales normales. Como dato destacable, puede remarcarse que en el colon distal, esta molécula no pudo ser detectada en los animales inducidos a desarrollar el CCR.

El análisis de la expresión génica del receptor ET_A , muestra que el mismo exhibe un incremento muy significativo a nivel del colon proximal ($p < 0,01$) (0,14 veces) en los animales inducidos a desarrollar el CCR. A nivel del colon distal también se produce un incremento aunque de menor magnitud.

En el colon proximal, los niveles de la expresión génica del receptor ET_B en la cuarta semana posinducción prácticamente permanecen inalterados en relación con los animales normales. Por el contrario, en el colon distal se verifica una disminución extremadamente significativa ($p < 0,001$) respecto de los animales sin tratar.

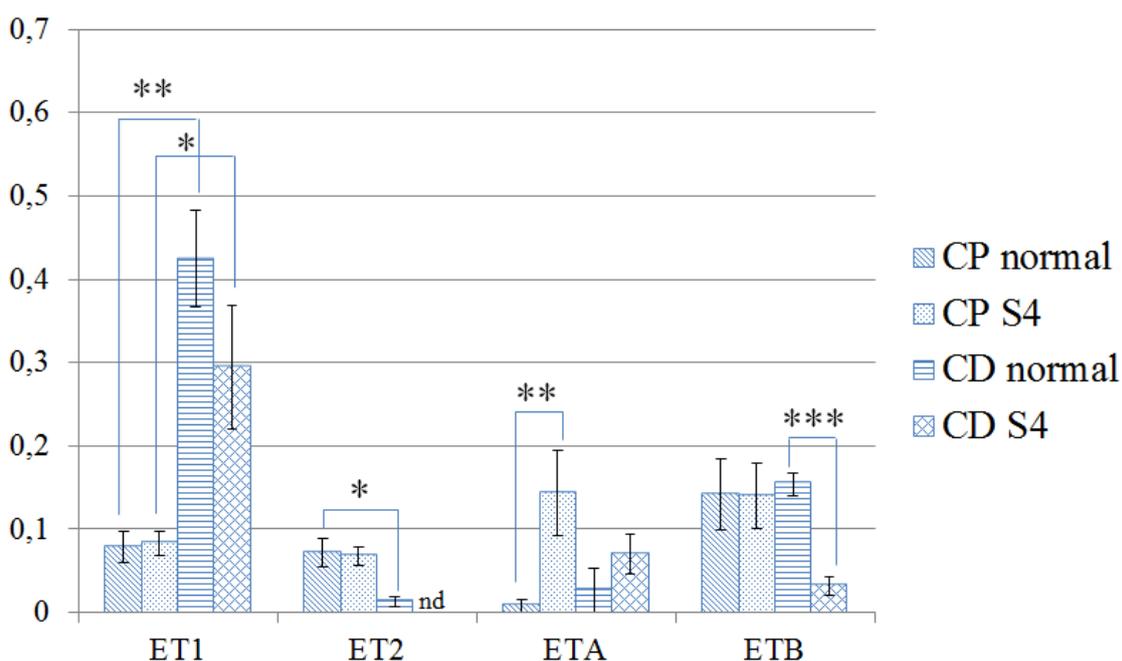


Figura 26. Expresión génica de ET-1, ET-2, ET_A y ET_B relativa al gen B2M en colon proximal y distal de ratones normales y tratados con AOM/SSD sacrificados en la cuarta semana del experimento (S4). Comparando con los animales normales, en la S4 se observan modificaciones de la expresión génica. Se observa una disminución en la expresión de ET-2, tal que el mismo no puede ser detectado en colon distal. A nivel de los receptores, se observa un marcado incremento de ET_A en colon proximal y una disminución notable de ET_B en colon distal. (nd: no detectable; * $p < 0,05$ diferencias estadísticamente significativas; ** $p < 0,01$ diferencias estadísticamente muy significativas; *** $p < 0,001$ diferencias extremadamente significativas). $X \pm SEM$, ($n=5$).

5.2.1.4 Análisis de inmunolocalización de las ET en la S4 posinducción

A la cuarta semana de inducción del CCR, ET-1 exhibió una marcación fundamentalmente citoplasmática en las células epiteliales displásicas del colon distal así como en las células localizadas en los focos de criptas aberrantes (Figura 27). En algunas secciones se observó inmunofluorescencia a nivel nuclear (no mostrado). En relación con ET-2, sólo se verificó inmunofluorescencia en un número restringido de criptas displásicas (Figura 27). En las regiones del colon en las que no se verifican alteraciones morfológicas significativas, se verificó que la inmunofluorescencia asume un patrón de distribución similar al verificado en los tejidos normales. Ambos péptidos exhibieron marcación citoplasmática en los linfocitos infiltrantes (Figura 27).

Como en los tejidos normales, el receptor ET_A exhibió una amplia distribución celular. En la Figura 28 puede observarse su inmunolocalización en el citoplasma de células displásicas de los FCA (izquierda) y en el citoplasma de linfocitos infiltrantes (derecha). Por el contrario, en el caso del receptor ET_B, la inmunolocalización resulta casi exclusivamente nuclear, como se observa en el tejido normal, principalmente en las zonas menos afectadas por el proceso patológico (Figura 28).

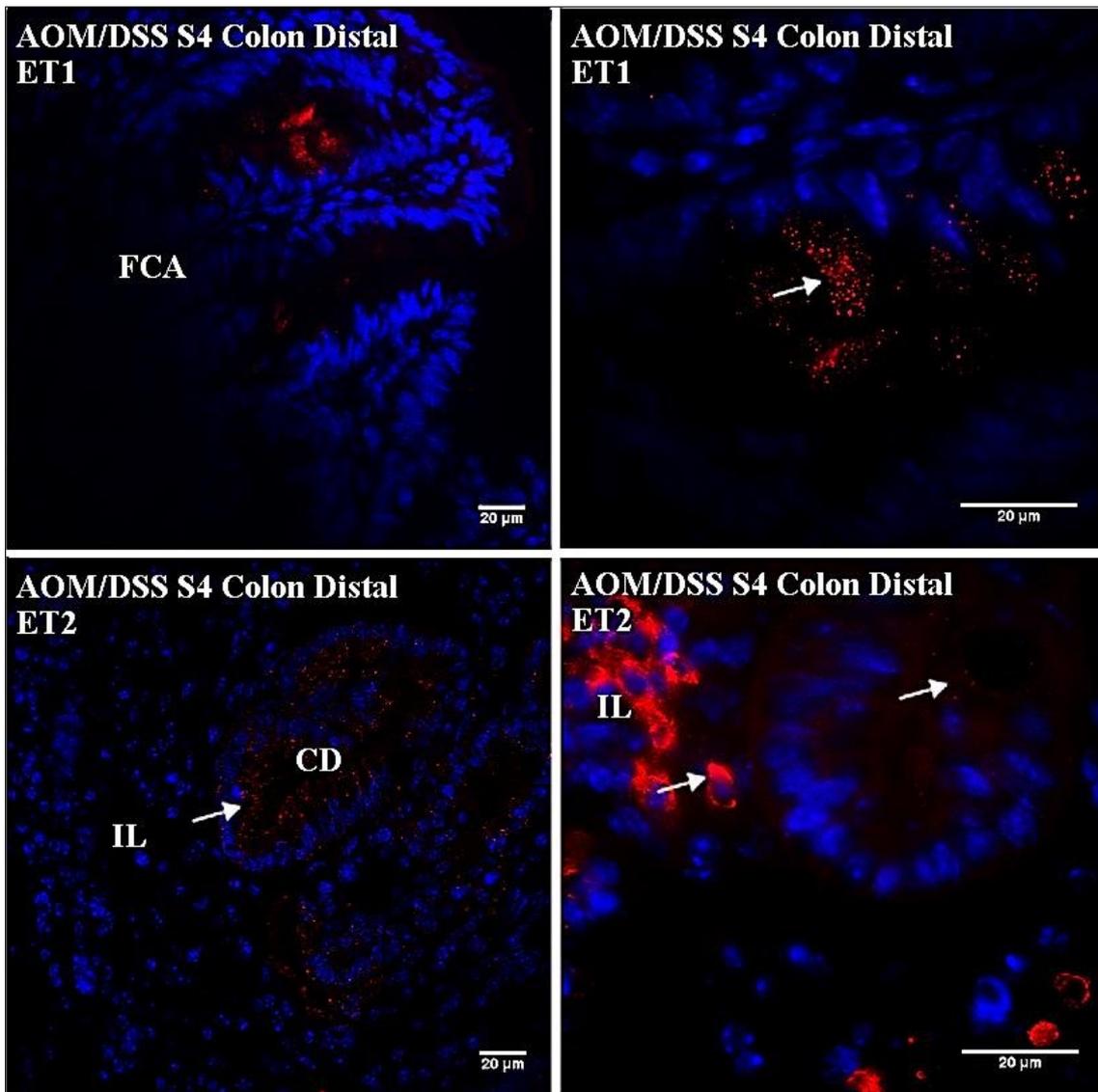


Figura 27. Imágenes representativas de la inmunolocalización de los péptidos ET-1 y ET-2 en colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la cuarta semana del experimento (S4). Se observa la distribución citoplasmática de ET-1 en células de lesiones precancerosas como los focos de criptas aberrantes. La localización de ET-2 se visualiza en una cripta displásica y en citoplasma de linfocitos infiltrantes en la lesión. A la derecha se muestran imágenes tomadas con mayor magnificación. FCA: foco de criptas aberrantes; IL: infiltrado linfocitario; CD: cripta displásica.

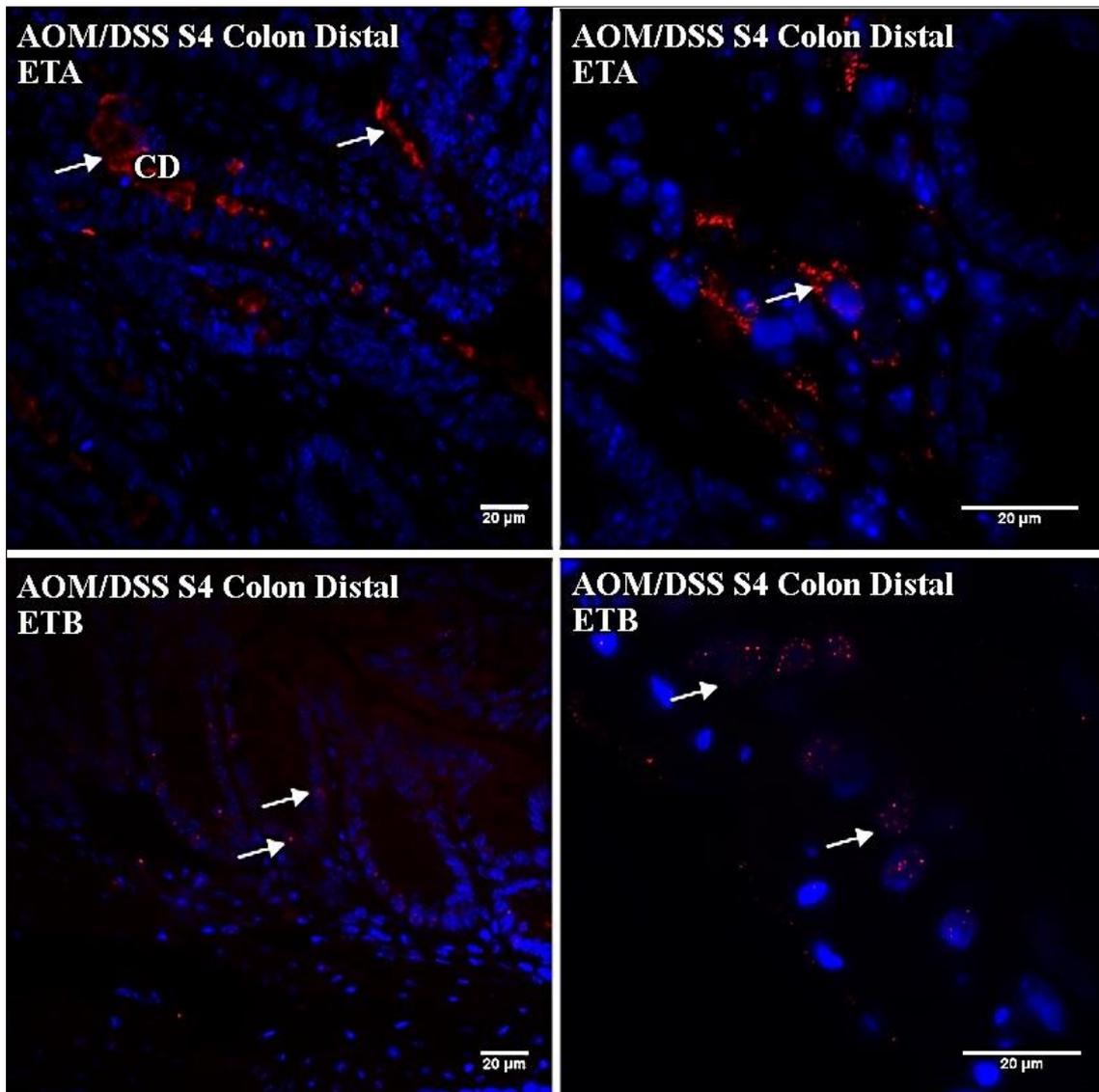


Figura 28. Imágenes representativas de la inmunolocalización de los receptores ET_A y ET_B en colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la cuarta semana del experimento (S4). Se observa la localización del receptor ETA en citoplasma de células en un FCA, o carcinoma intramucoso, también, a la derecha se observa con mayor amplificación la presencia del receptor ETA en células infiltrantes dentro de la lesión. La localización de ETB se visualiza, en parte, en las zonas menos afectadas por la patología, como puede verse en la imagen de la izquierda. Sin embargo, en la imagen de la derecha se observan núcleos de células epiteliales con pérdida de polaridad, marcados por ETB . A la derecha se muestran imágenes tomadas a mayor aumento. CD: cripta displásica.

5.2.1.5 Análisis de expresión génica e inmunolocalización de los péptidos natriuréticos en la S4

Tanto en el colon proximal como en el distal los niveles de expresión génica del péptido natriurético atrial exhiben incrementos del orden de 0,09 y 0,05 veces respectivamente, en relación con el tejido normal. Sin embargo, esos incrementos no resultan estadísticamente significativos.

En el caso del péptido natriurético tipo C, en la S4 prácticamente no se verificaron cambios en colon proximal, aunque en colon distal se verificó una disminución del orden de 0,09 veces, con respecto al mismo segmento de animales normales (Figura 29).

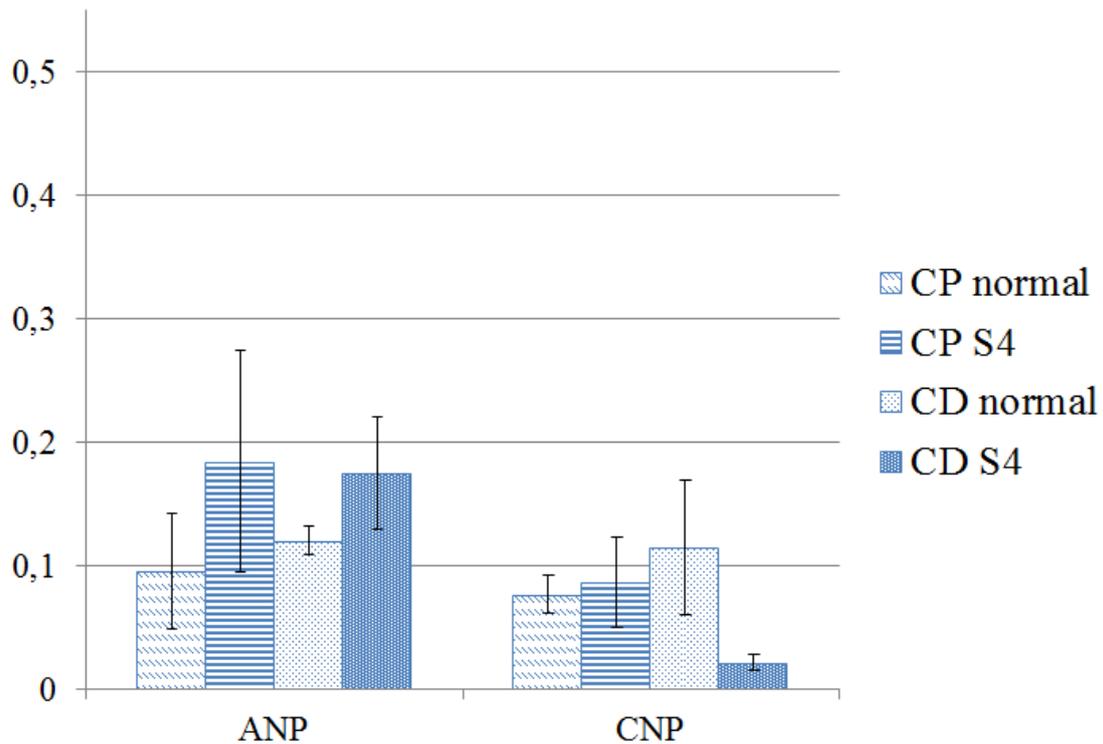


Figura 29. Expresión génica de los péptidos natriuréticos ANP y CNP relativa al gen B2M en colon proximal y distal de ratones normales y tratados con AOM/SSD, sacrificados a la cuarta semana del experimento (S4). Se observa que la expresión génica de ANP en tejido patológico tiene una tendencia a aumentar, aunque no lo hace significativamente. Por otro lado, la expresión génica de CNP en colon distal patológico presenta una importante disminución con respecto al colon distal normal, aunque dichas diferencias no son significativas. $X \pm SEM$, ($n=3$).

Ambos péptidos natriuréticos muestran una amplia distribución celular y tisular en las regiones no afectas, mientras que en las lesiones (FCA) y zonas con inflamación, se verifican dos localizaciones principales en las que se visualizan éstos péptidos: los núcleos displásicos elongados y aumentados de tamaño, así como el citoplasma de células presentes en el infiltrado linfocitario (Figura 30). También se observa marcación en el citoplasma de células aisladas, de las criptas displásicas.

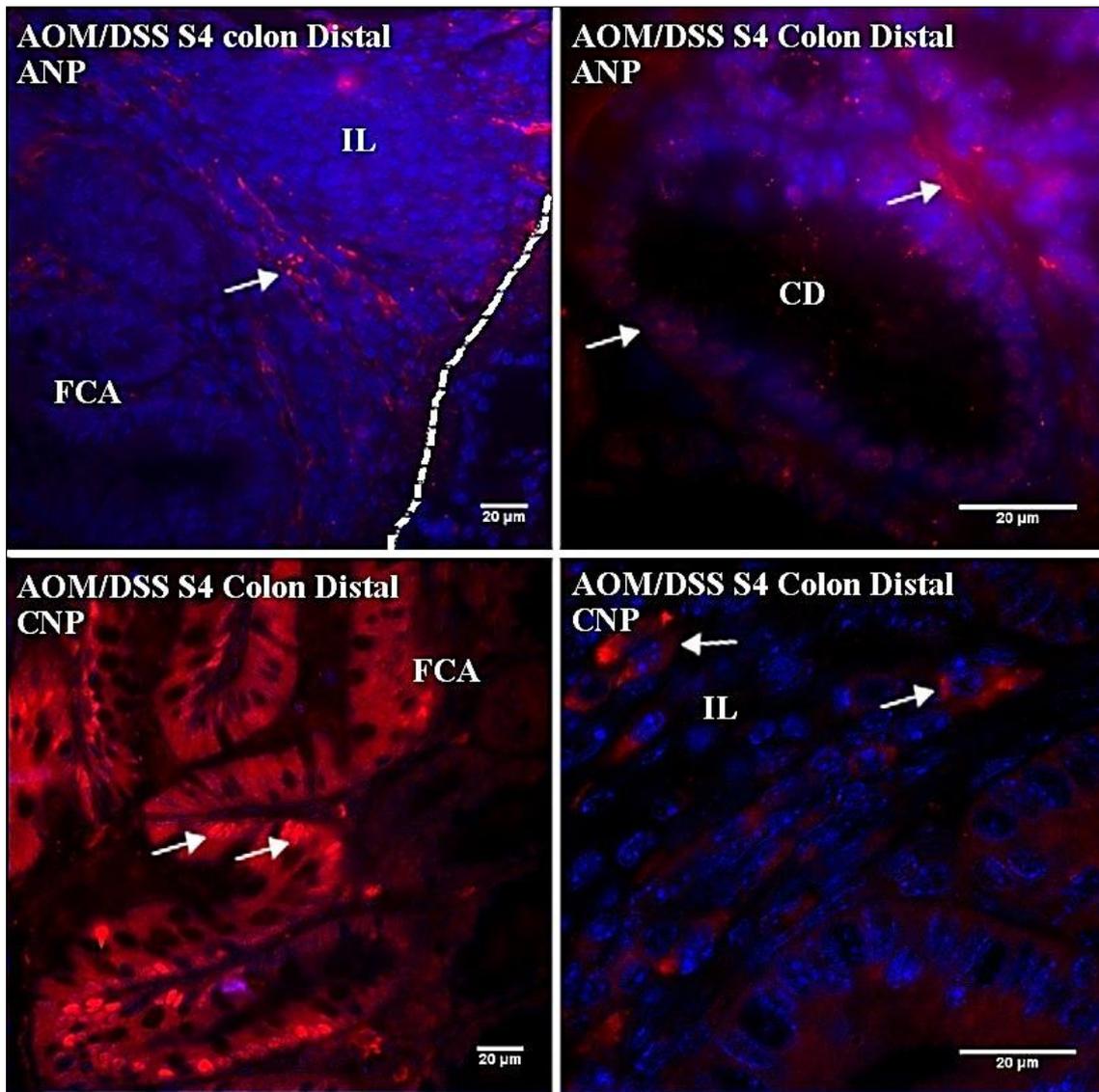


Figura 30. Imágenes representativas de la inmunolocalización de los péptidos ANP y CNP en colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la cuarta semana del experimento (S4). Se observa marcación de ANP en citoplasma de células del infiltrado linfocitario en la mucosa (izquierda), y en los núcleos de una cripta de un FCA (derecha). También se observa marcación nuclear de CNP en FCA (izquierda) y marcación citoplasmática en el infiltrado linfocitario (derecha). A la derecha se muestran imágenes tomadas a mayor aumento. FCA: foco de criptas aberrantes; IL: infiltrado linfocitario; CD: cripta displásica.

En esta sección, se demostró que el colon de los animales tratados con AOM/SSD durante cuatro semanas exhibe, como principales manifestaciones histopatológicas, la presencia de procesos inflamatorios con desarrollo de FCA. En éstas, se pueden observar displasias leves, mientras que otras regiones exhiben adenocarcinomas *in situ*. Mediante el uso de MONL, se evidenció además un cambio significativo del grado de orientación de las fibras colágenas, tendientes a la desorganización del tejido. Con respecto a la expresión génica de las moléculas estudiadas, los datos más relevantes del estadio fueron en colon distal, el abrupto silenciamiento de la expresión de ET-2 y la muy significativa disminución de la expresión de ET_B. En el colon

proximal, el dato más relevante es el aumento muy significativo de la expresión génica del receptor ET_A. Los principales sitios de inmunolocalización de endotelinas y péptidos natriuréticos en colon inducido por AOM/SSD se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 7. Se resumen las principales localizaciones de los péptidos vasoactivos y receptores en el colon murino de animales tratados por 4 semanas.

Péptidos y receptores	Localización tisular
ET-1	En células displásicas localizadas en los FCA. Localización citoplasmática.
ET-2	Restringida a las regiones en las que no se verifican alteraciones morfológicas significativas. Asume un patrón de distribución similar al verificado en los tejidos normales, esto es en la capa mucosa, principalmente en las células columnares de las criptas de Lieberkühn. Localización citoplasmica.
ET _A	Principalmente en células displásicas localizadas en los FCA y en el citoplasma de linfocitos infiltrantes. Localización citoplasmática.
ET _B	Principalmente localizado en las zonas menos afectadas por el proceso patológico, con distribución fundamentalmente nuclear.
ANP	En células displásicas, de localización nuclear. En los infiltrados linfocitarios, a nivel citoplasmática.
CNP	En células displásicas, localización nuclear y en los infiltrados linfocitarios, citoplasmática.

5.2.2 Octava semana del tratamiento con AOM/SSD

5.2.2.1 Análisis histológico

En la octava semana posterior a la inyección de AOM (S8) todos los ratones sacrificados poseen al menos una lesión con displasia severa, las que están acompañadas de adenocarcinomas *in situ* bien diferenciados. La mayoría de las lesiones son planas, aunque en este estadio pueden verificarse algunas pediculadas de características tubulares o tubulovelloosas que se pueden clasificar como tipo T0, ya que no invaden la capa submucosa (Figura 31A).

En las regiones con lesiones y en las áreas adyacentes, se observa una marcada depleción de células goblet. Tal como puede visualizarse en la Figura 31B, la proporción de mucopolisacáridos ácidos (AA+) supera la de los neutros (PAS+).

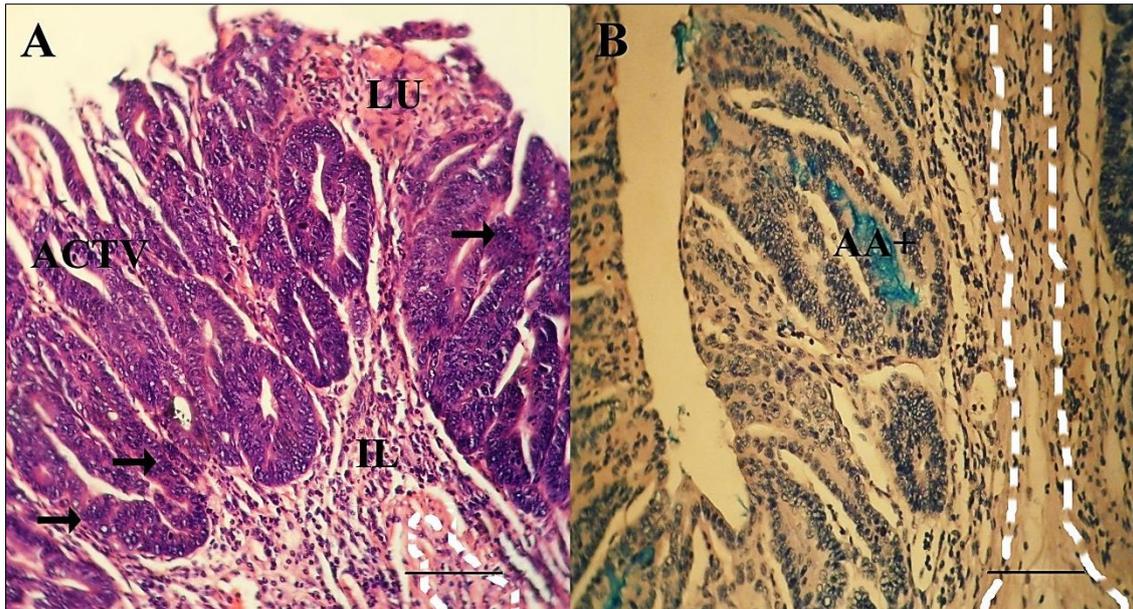


Figura 31. Imágenes representativas de cortes transversales de colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la octava semana del experimento. A) Tinción de H&E, se observa un microadenoma con carcinoma *in situ* tubulovelloso, con núcleos hiper cromáticos y displasia severa, ausencia de células goblet y una lesión ulcerosa. B) Tinción de PAS/AA, se observa presencia de unas pocas células goblet productoras de mucopolisacáridos ácidos (AA+), displasia severa e infiltrado linfocitario difuso. LU: lesión ulcerativa; IL: infiltrado linfocitario; ACTV: adenocarcinoma tubulovelloso; línea punteada: muscular de la mucosa. Barra = 50µm.

5.2.2.2 Análisis bidimensional cualitativo y cuantitativo del colágeno por MONL

Tal como ocurre en la cuarta semana, en la octava, las principales alteraciones se verifican a nivel del colon distal. En las imágenes de secciones transversales de este segmento del colon, tanto teñidas con H&E como las visualizadas por SHG se puede detectar cualitativamente un incremento significativo de las fibras colágenas fundamentalmente a nivel de la submucosa y en menor medida en la mucosa (Figura 32, SHG). Adicionalmente, se observan prominentes infiltrados linfocitarios tanto en la submucosa como en la mucosa (Figura 32 H&E). En el análisis cuantitativo de las imágenes de SHG se corrobora que a la S8 hay un incremento de las fibras colágenas a nivel de la submucosa, con respecto a las observadas en tejido normal y a las verificadas en la S4. Sin embargo, la RA del tejido patológico muestra la misma tendencia que en la S4, con diferencias muy significativas ($p < 0,01$) respecto al tejido normal, (Figura 32, FFT).

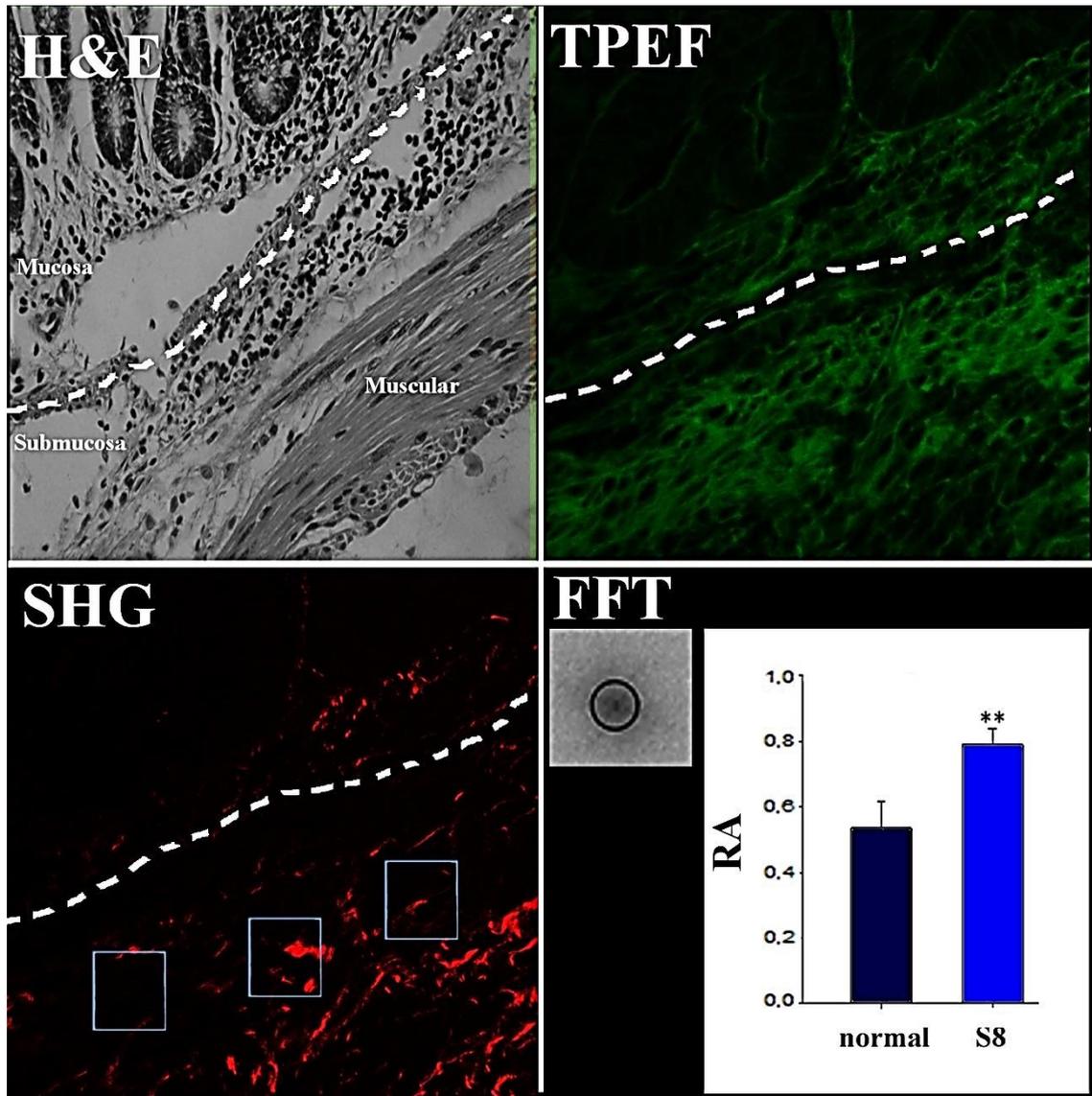


Figura 32. Imagen de H&E, TPEF y de SHG de un corte transversal de colon distal de ratón tratado con AOM/SSD, sacrificado a la octava semana del experimento (S8). En las imágenes se observan las capas: mucosa y submucosa, separadas por la muscular de la mucosa (línea punteada). También se muestra una imagen de la FFT de uno de los ROI y su ajuste elíptico, junto con el gráfico de la RA de ratones control y tratados (S8) ($n=5$).

5.2.2.3 Análisis de la expresión génica del sistema de las ET en la S8 posinducción

La expresión génica de la ET-1, tanto en el colon proximal como en el distal, exhibe un perfil semejante al que se observa en la cuarta semana, excepto a nivel del colon distal patológico en el que se observa una tendencia incremental, aunque estas diferencias no son significativas en relación con las observadas en los animales normales.

En relación con la ET-2, a la octava semana, se observa que a nivel del colon proximal se verifica una disminución muy significativa ($p<0,01$) de la expresión génica de este péptido. Esta disminución se hace más notable a nivel del colon distal en el que no pudieron ser detectados los transcritos de ET-2 (Figura 33).

El análisis de los niveles de expresión del receptor ET_A en la S8, muestra que en ambos segmentos del colon se verifican aumentos significativos ($p < 0,01$, colon proximal y $p < 0,05$, colon distal) en relación con los valores obtenidos en los animales normales (Figura 33). Dichas diferencias son aún más marcadas que las verificadas en la S4 posinducción.

El receptor ET_B exhibe un perfil de expresión génica semejante al visualizado en la S4 posinducción (Figura 33), aunque en el colon distal las diferencias son menos marcadas ($p < 0,05$) que las visualizadas en la cuarta semana.

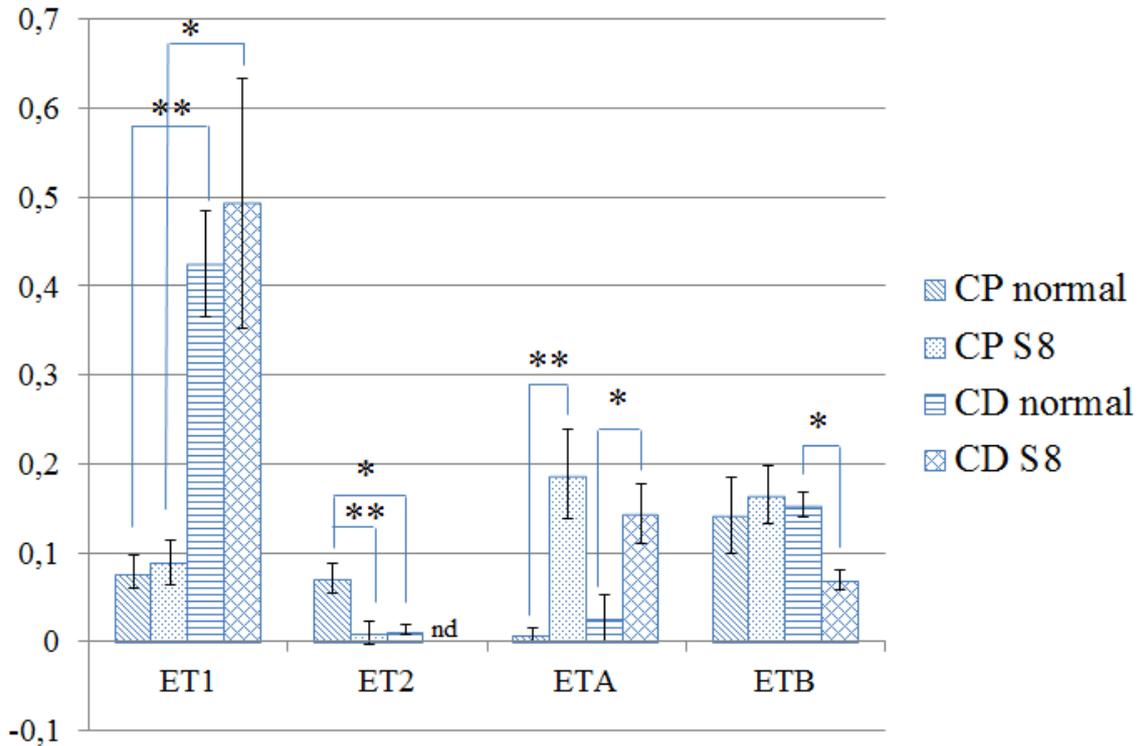


Figura 33. Expresión génica de ET-1, ET-2, ET_A y ET_B relativa al gen B2M en colon proximal y distal de ratones normales y tratados con AOM/SSD sacrificados en la octava semana del experimento (S8). Similar a lo que ocurre en la S4, ET-2 no es detectada en colon distal, a su vez se observa una marcada disminución de su expresión en colon proximal. Además del incremento en la expresión génica de ET_A en colon proximal, en este estadio también se incrementa su expresión en colon distal. La expresión de ET_B no es tan pronunciada como en la S4. (nd: no detectable; * $p < 0,05$ diferencias estadísticamente significativas; ** $p < 0,01$ diferencias estadísticamente muy significativas). $X \pm SEM$, (n=5).

5.2.2.4 Análisis de inmunolocalización de las ET en la S8 posinducción

La localización de la ET-1 resulta esencialmente citoplásmica en las células epiteliales displásicas localizadas en los focos de criptas aberrantes (Figura 34) y microadenomas, en los cuales parece estar rodeando vesículas secretoras. En algunas regiones, sin embargo, se observa además marcación de localización nuclear. También se visualiza en el citoplasma de linfocitos infiltrantes (no mostrada). En la submucosa, ET-1 se localiza en células musculares que rodean

los vasos sanguíneos, (no mostrada). En concordancia con los resultados observados a nivel de expresión génica, no se pudo detectar señal inmunofluorescente para ET-2 (Figura 34).

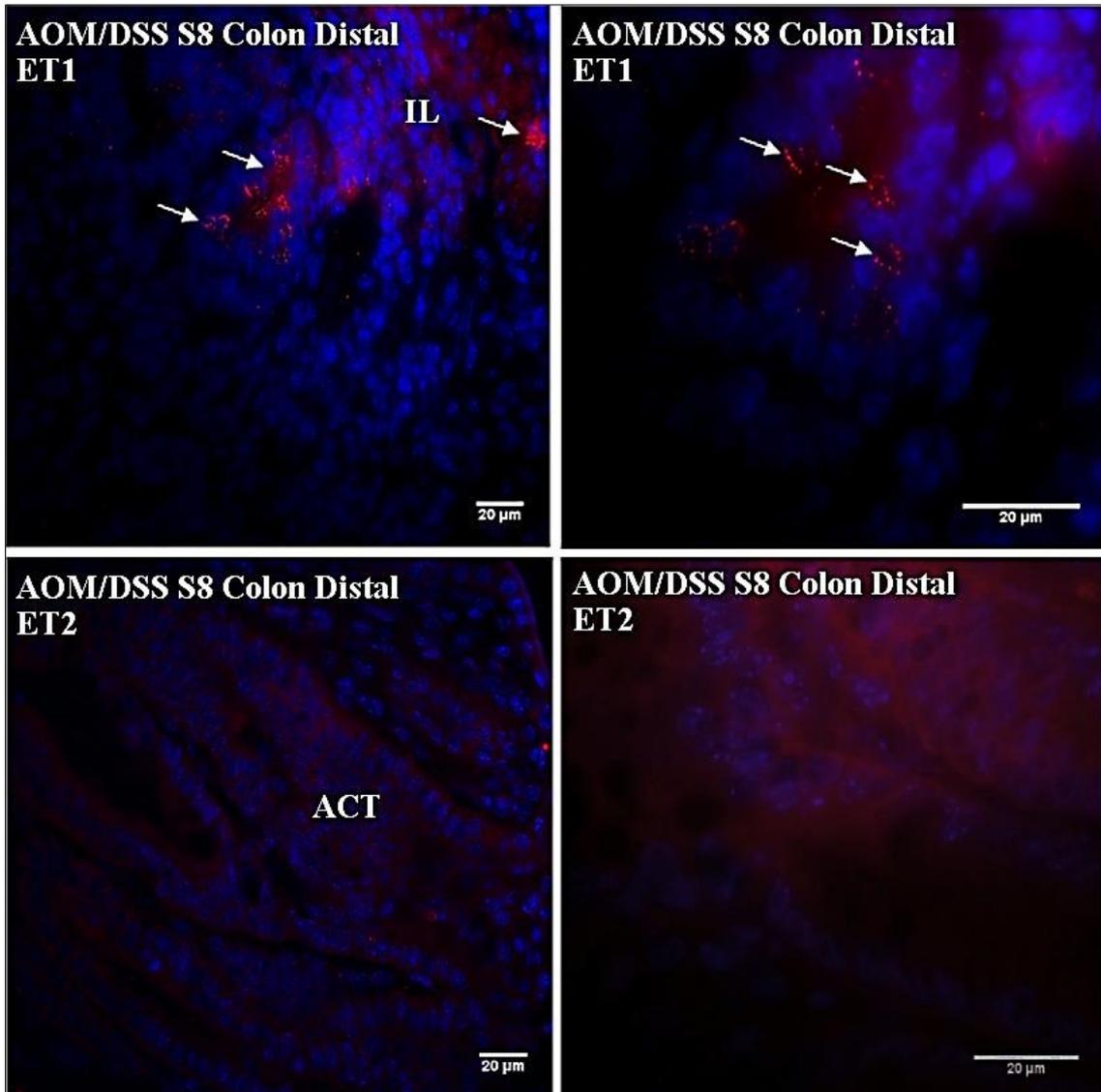


Figura 34. Imágenes representativas de la inmunolocalización de los péptidos ET-1 y ET-2 en colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la octava semana del experimento (S8). Se observa marcación citoplasmática de ET-1, en algunas ocasiones rodeando al núcleo celular y en otras, delimitando lo que podrían ser vesículas secretoras, de células displásicas. No se observa marcación de ET-2. ACT: adenocarcinoma tubular.

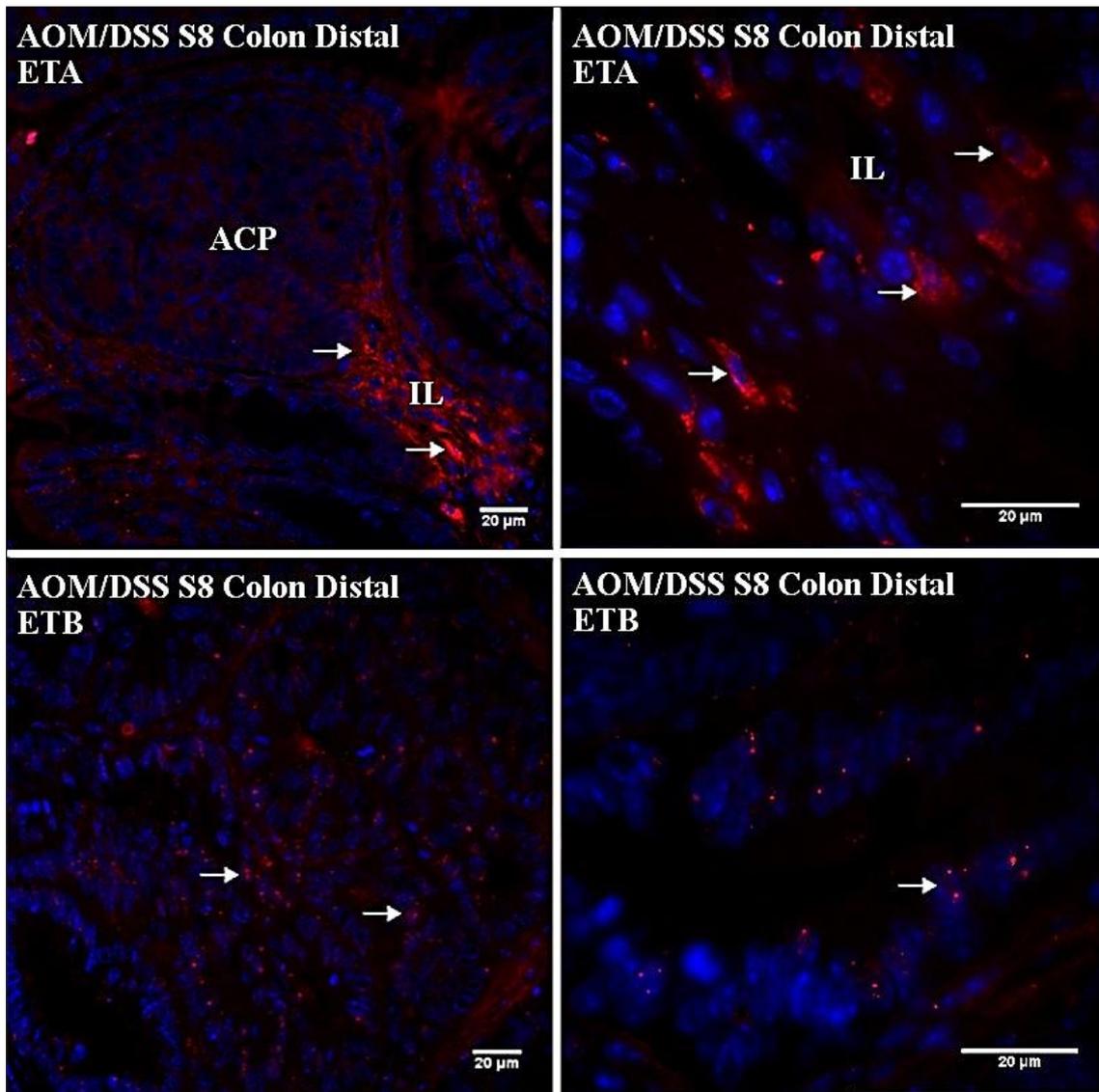


Figura 35. Imágenes representativas de la inmunolocalización de los receptores ET_A y ET_B en colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la octava semana del experimento (S8). Se observa inmunoseñal de ET_A en el infiltrado linfocitario del tallo de un microadenoma pediculado. La señal es exclusivamente citoplasmática, ocupando gran parte del mismo. La inmunomarcación de ET_B, por otro lado, es nuclear, ubicándose preferentemente en células displásicas, más que inflamatorias. ACP: adenocarcinoma pediculado; IL: infiltrado linfocitario.

Con el progreso de la patología, la señal inmunopositiva para ET_A se verifica fundamentalmente en células linfoides. La marcación resulta muy intensa en el citoplasma de linfocitos infiltrantes, como se observa en el tallo del microadenoma pediculado de la Figura 35. Por otra parte, la localización del receptor ET_B exhibió una señal significativamente más débil, con el mismo patrón nuclear que en estadios anteriores, principalmente en las células cancerosas (Figura 35).

5.2.2.5 Análisis de expresión génica e inmunolocalización de los péptidos natriuréticos en la S8

A diferencia de lo que se verificó en la S4, en la que la expresión génica de ANP mostraba un incremento 0,09 veces superior en colon proximal patológico con respecto al normal, en la S8 prácticamente no se observan modificaciones de su expresión en este segmento. Por el contrario, en colon distal, la tendencia incremental se mantiene, aunque los datos exhiben un alto grado de variabilidad, probablemente como consecuencia de la afectación diferencial de este segmento del colon a la S8.

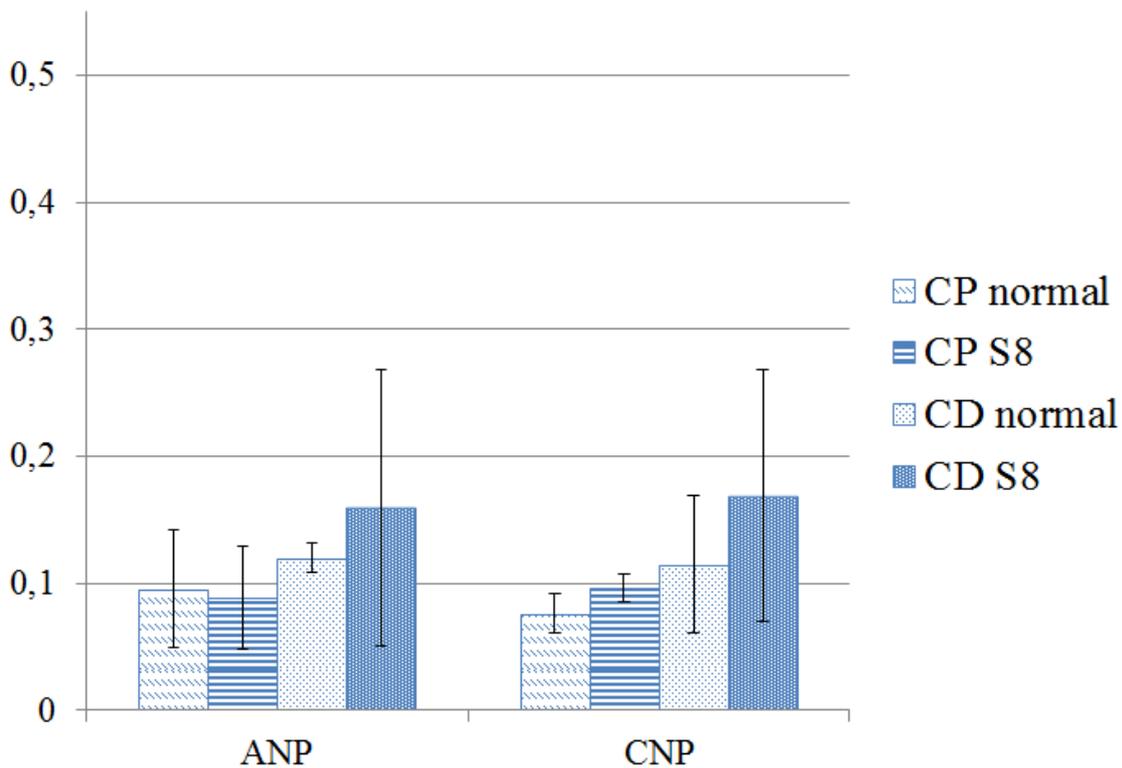


Figura 36. Expresión génica de los péptidos natriuréticos ANP y CNP relativa al gen B2M en colon proximal y distal de ratones normales y tratados con AOM/SSD, sacrificados a la octava semana del experimento (S8). Si bien la expresión génica de ANP mantiene en colon distal la tendencia al aumento que presentó en la S4, esto no ocurre en colon proximal. Por otro lado, la expresión génica de CNP en colon distal, se mostró en aumento, siendo esto opuesto a lo que ocurrió en la S4. $X \pm SEM$, ($n=3$).

Contrariamente a lo que se observó en la S4, el cambio más remarcable en la expresión génica de CNP se observa en colon distal, mostrando una tendencia incremental (0,05 veces con respecto al tejido normal) (Figura 36).

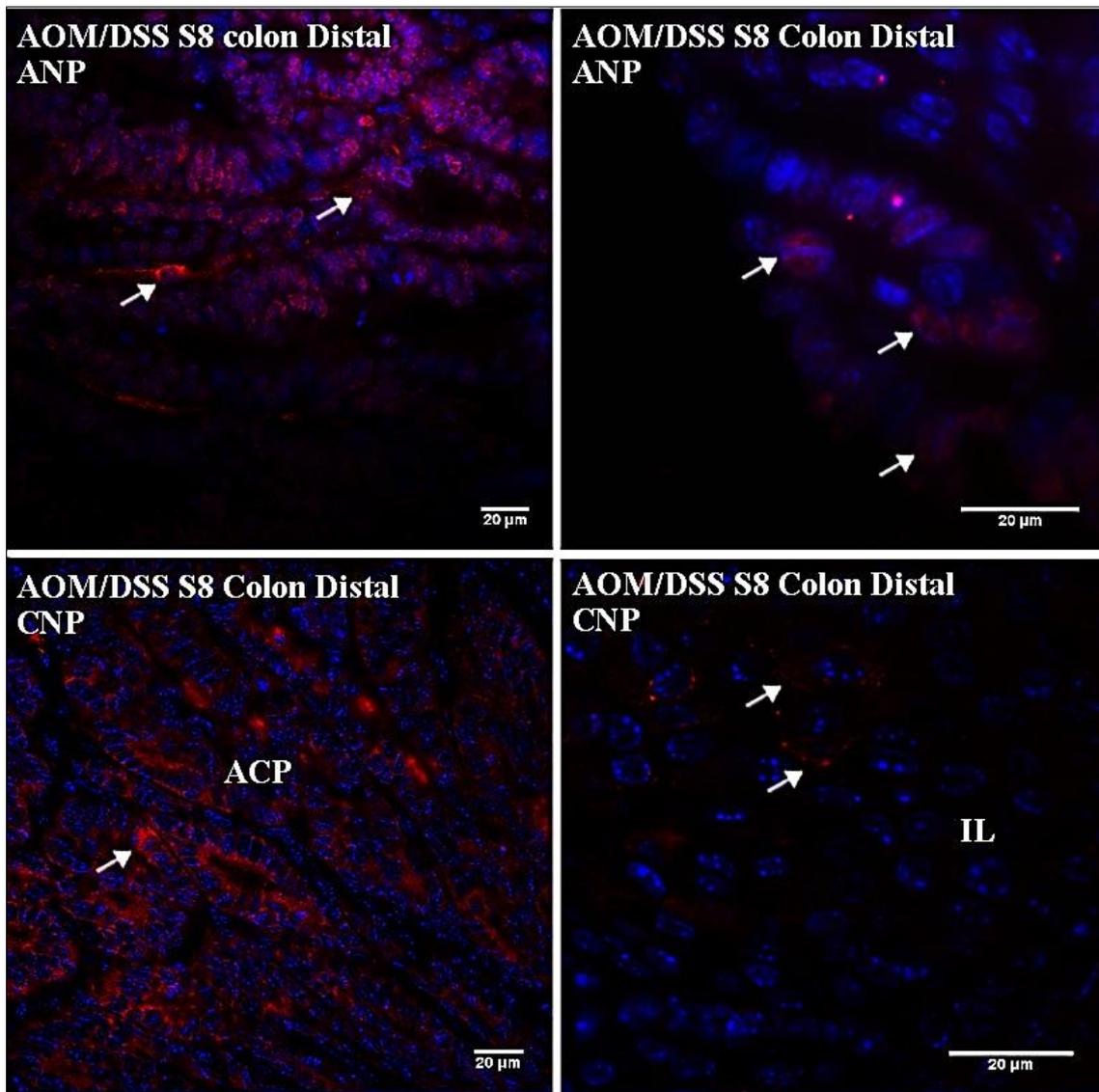


Figura 37. Imágenes representativas de la inmunolocalización de los péptidos ANP y CNP en colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la octava semana del experimento (S8). Se observa localización nuclear de ANP en los adenocarcinomas, a la derecha se observa una figura mitótica con marcación de ANP (flecha). La marcación de CNP se observa en citoplasma de las células tumorales y en citoplasma de las células inflamatorias. IL: infiltrado linfocitario; ACP: adenocarcinoma pediculado.

La marcación de ambos péptidos exhibe un patrón semejante al observado en el estadio anterior (S4). Sin embargo, en este estadio, el agravamiento de la patología permite visualizar un número superior de figuras mitóticas, los adenocarcinomas incrementan en tamaño y se observan menos estructuras glandulares bien diferenciadas. En este contexto, ANP exhibe marcación nuclear en las regiones de estructuras glandulares alteradas, en el interior de los tumores y en el citoplasma de algunos linfocitos infiltrados. El CNP por otra parte, exhibe una marcación más dispersa en el citoplasma de células glandulares y linfoides (Figura 37).

Resumiendo los resultados hallados en los animales tratados con AOM/SSD durante ocho semanas, se demostró que el colon en este estadio presenta, fundamentalmente,

adenocarcinomas *in situ* de características planas, aunque también pudieron verificarse algunos pediculados, de características tubulares o tubulovellosas. El cambio del grado de orientación de las fibras colágenas, caracterizado mediante el uso de MONL, mantiene el grado de variación verificado a la cuarta semana. Con respecto a la expresión génica de las moléculas estudiadas, en colon distal los datos más relevantes fueron, el mantenimiento del silenciamiento de la expresión de ET-2 y la significativa disminución de la expresión de ET_B, y el aumento de expresión de ET_A. En el colon proximal, el dato más relevante es el aumento muy significativo de la expresión génica del receptor ET_A. Los principales sitios de inmunolocalización de endotelinas y péptidos natriuréticos en colon inducido por AOM/SSD se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 8. . Se resumen las principales localizaciones de los péptidos vasoactivos en el colon murino de animales tratados por 8 semanas.

Péptidos y receptores	Localización tisular
ET-1	Se localiza principalmente en las células epiteliales displásicas localizadas en los FCA, microadenomas y adenocarcinomas <i>in situ</i> . También se observó inmunomarcación en linfocitos infiltrantes, en vasos sanguíneos de la submucosa. Principalmente citoplásmica y en ocasiones nuclear.
ET-2	Este péptido sólo pudo visualizarse en las regiones en las que no se verifican alteraciones morfológicas significativas. Asume un patrón de distribución similar al verificado en los tejidos normales, esto es en la capa mucosa, principalmente en las células columnares de las criptas de Lieberkühn. La localización es fundamentalmente citoplásmica.
ET _A	Se verifica principalmente en células linfoides. La marcación resulta muy intensa en el citoplasma de los linfocitos infiltrantes.
ET _B	Distribución débil en las regiones lesionadas, la localización es nuclear.
ANP	Se verifica en las regiones de estructuras glandulares alteradas, en el interior de los tumores y en el citoplasma de algunos linfocitos infiltrados. La localización es nuclear.
CNP	Exhibe una marcación más difusa, principalmente se localiza en el citoplasma de células glandulares y linfoides.

5.2.3 Decimosexta semana del tratamiento con AOM y SSD

5.2.3.1 Análisis histológico

El análisis histológico de las muestras obtenidas en la decimosexta semana posterior a la inyección de AOM (S16), permite determinar que en las áreas patológicas los tejidos muestran displasias severas caracterizadas por la presencia de adenocarcinomas intramucosos bien diferenciados. Adicionalmente, en este estadio se visualizan regiones con figuras de “necrosis sucia”, en las que pueden observarse zonas de lúmenes malignos que en las tinciones de H&E se tornan fuertemente eosinófilas, frecuentemente combinadas con restos de células necróticas (Figura 38A). A diferencia de lo observado a la S8, en la que las lesiones son fundamentalmente planas, en este estadio adquieren, mayoritariamente, las características de tumores pediculados y en menor proporción, sésiles. Su apariencia histológica es altamente variable, pudiendo ser tubulares, vellosas o tubulovellosas. Con la tinción de PAS/AA se evidencia una remarcable depleción de células goblet y en el seno de las regiones tumorales, se visualizan zonas necróticas tanto PAS+ como AA+ (Figura 38B).

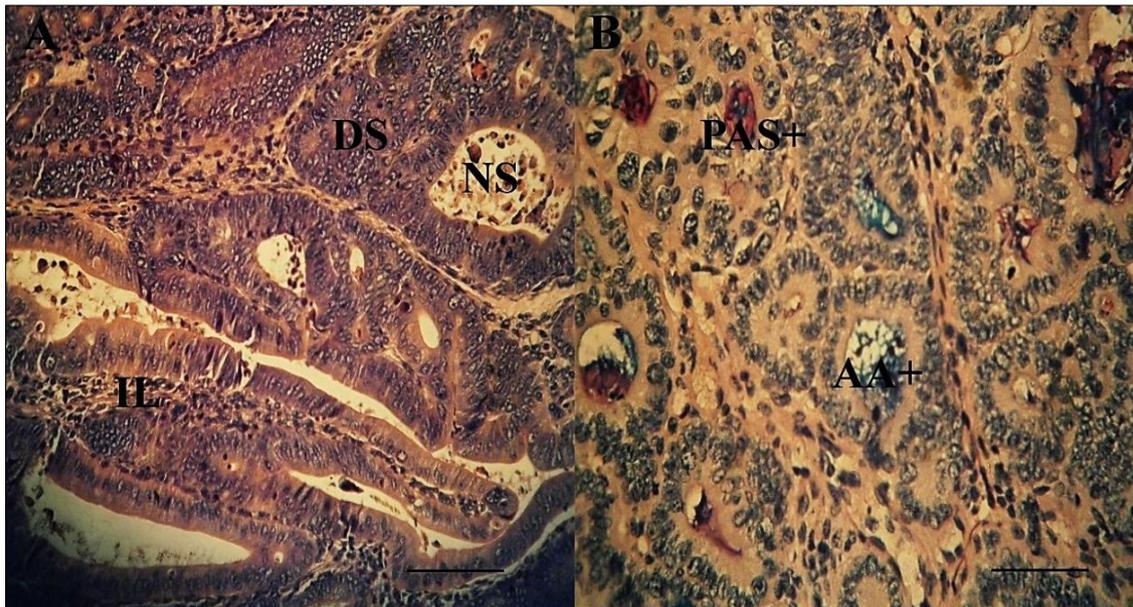


Figura 38. Imágenes representativas de cortes transversales de colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la decimosexta semana del experimento. A) Tinción de H&E: se observa un carcinoma intramucoso, con displasia severa, ausencia de células goblet y zonas necróticas. B) Tinción de PAS/AA: se observan algunas zonas necróticas PAS+ y otras AA+. Barra = 50µm.

Como es característico en los tumores del modelo murino empleado, el grado de invasividad desarrollado es leve. Del material analizado, sólo se verificó un único caso de adenocarcinoma pediculado tubular invasivo en el tallo (T1 en la escala TNM, G1), el cual se muestra en la Figura 39. En ésta se observa un corte transversal al tallo del adenocarcinoma pediculado, en el

que puede distinguirse la capa muscular de la mucosa rodeando la zona de la invasión así como células tumorales próximas a las zonas de neovascularización.

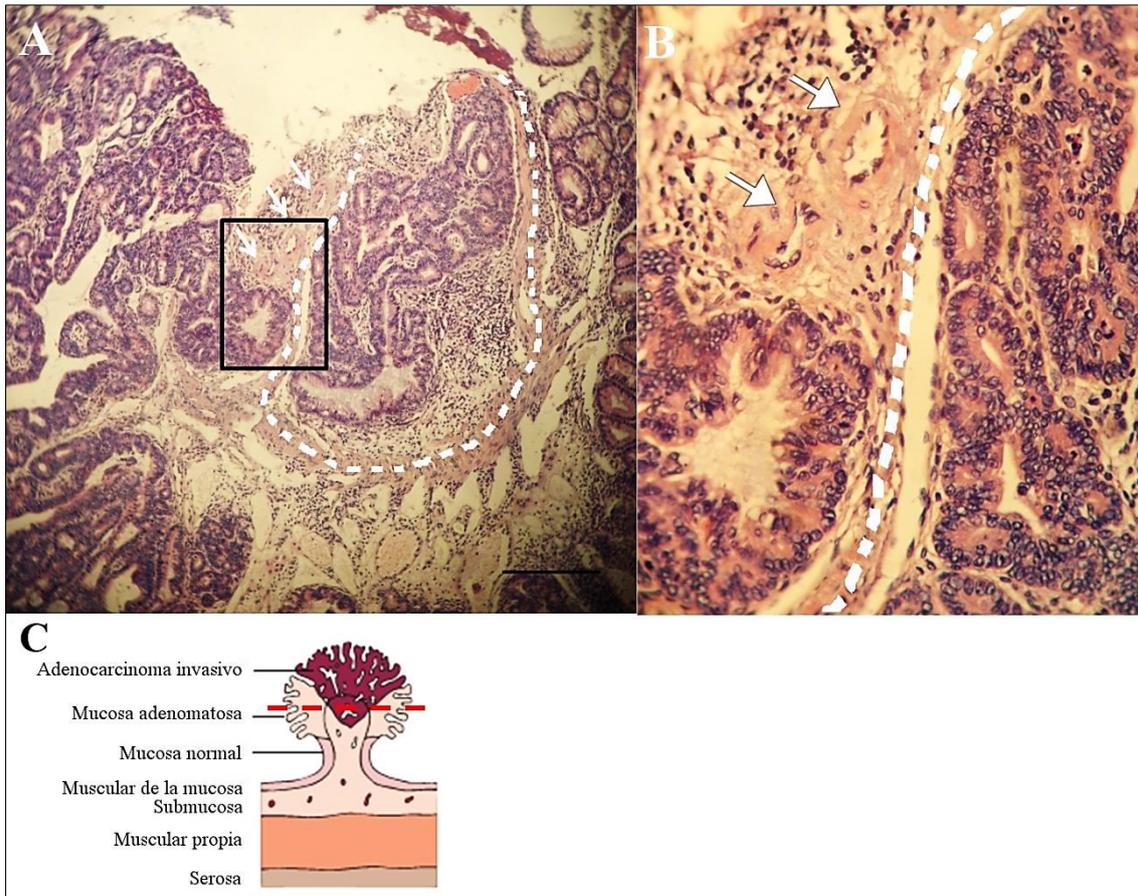


Figura 39. Imagen de H&E de un corte transversal al tallo de un adenocarcinoma pediculado invasivo. A) Se observa un adenocarcinoma pediculado invasor. B) Se muestra con mayor magnificación la zona indicada con un rectángulo en (A). A ambos lados de la muscular de la mucosa se observa que existen células tumorales, lo que refuerza que se verifican procesos de invasividad de la submucosa. C) Se muestra una representación esquemática de esta manifestación del tumor así como del proceso de invasión encontrado, se indican además las capas histológicas y en línea punteada roja, el corte que se realizó para obtener las imágenes A y B. línea punteada blanca: muscular de la mucosa. Barra: =100µm

5.2.3.2 *Análisis bidimensional cualitativo y cuantitativo del colágeno por MONL*

En la Figura 40 se observan imágenes representativas del colon distal de animales sometidos a la inducción del desarrollo tumoral a la decimosexta semana, tanto de secciones teñidas con H&E, como visualizadas por TPEF y SHG, respectivamente. En las dos primeras imágenes (Figura 40, H&E y TPEF) se corroboran las alteraciones morfológicas mientras que en la imagen de SHG se observa el incremento de la matriz colágena de las zonas alteradas por la presencia del desarrollo tumoral. Pese a que las imágenes de SHG permiten corroborar el grado de desorganización que exhiben las fibras colágenas (Figura 40, SHG), los valores obtenidos para la RA de los tejidos en este estadio, no muestran valores significativamente diferentes de

los obtenidos en las S4 y S8, manteniéndose las diferencias en relación con los tejidos normales (Figura 40, FFT).

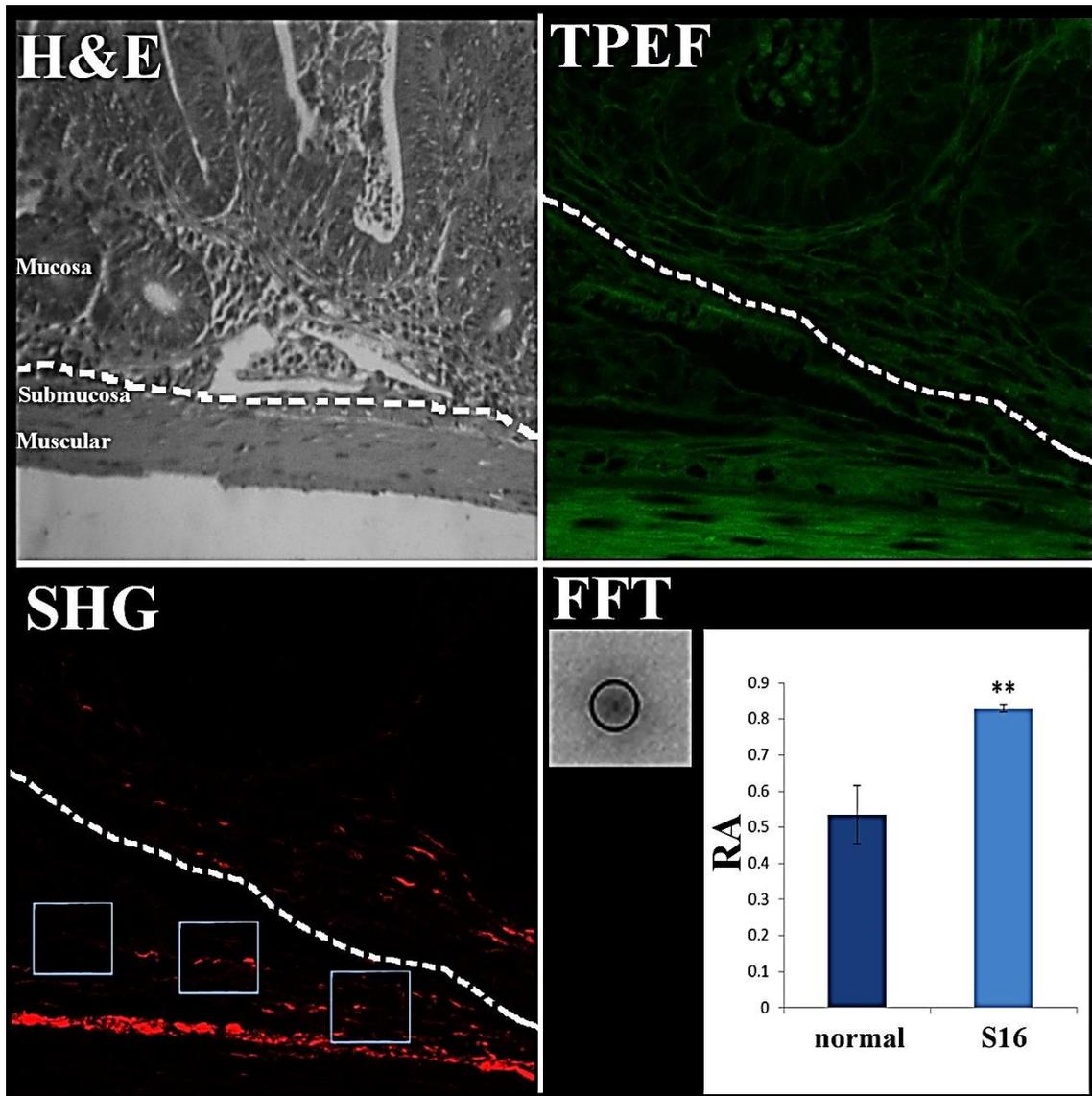


Figura 40. Imagen de H&E, TPEF y de SHG de un corte transversal de colon distal de ratón tratado con AOM/SSD, sacrificado a la decimosexta semana del experimento (S16). En las imágenes se observan las capas: mucosa y submucosa, separadas por la muscular de la mucosa (línea punteada). También se muestra una imagen de la FFT de uno de los ROI y su ajuste elíptico, junto con el gráfico de la RA de ratones control y tratados (S16) ($n=5$).

5.2.3.3 Análisis de la expresión génica del sistema de las ET en la S16 posinducción

Acompañando el grado de alteración del tejido canceroso, los niveles de expresión génica de ET-1 en el colon distal, disminuyen significativamente ($p < 0,05$) respecto de la encontrada en los animales normales, como puede observarse en la Figura 41. A su vez, esta disminución, trae aparejada la pérdida de la expresión diferencial que se observa entre los segmentos proximal y distal del colon, opuestamente a lo observado en los estadios previos.

En el caso de ET-2, los niveles de expresión en colon proximal a la S16 muestran una disminución respecto a los verificados en los animales normales, aunque dicha tendencia no resulta estadísticamente significativa. En el colon distal, los niveles de expresión génica de dicho péptido tampoco pueden ser detectados, como ocurre en la S4.

En cuanto al comportamiento de la expresión génica del receptor ET_A, en colon proximal se mantienen las diferencias incrementales entre los bajos niveles verificados en los animales normales y los observados en los sometidos a la inducción en la S16, lo que también se observa en las S4 y S8. Sin embargo, en colon distal, se verifica una disminución de 0,06 veces con respecto a la S8, por lo que las diferencias con el tejido normal no son estadísticamente significativas.

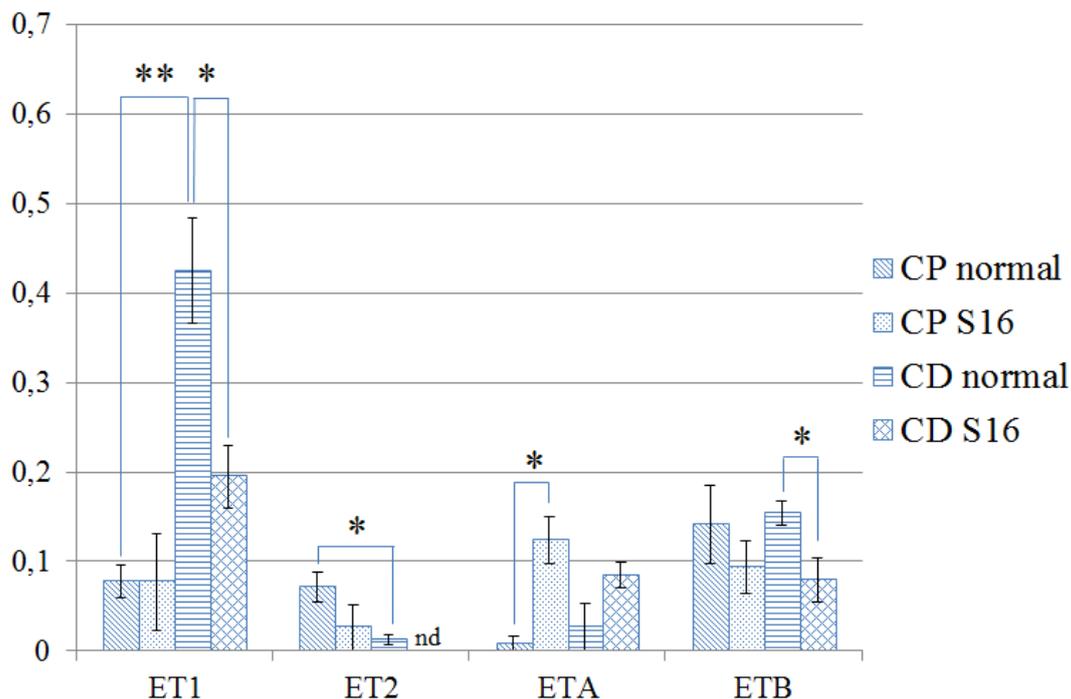


Figura 41. Expresión génica de ET-1, ET-2, ET_A y ET_B relativa al gen B2M en colon proximal y distal de ratones normales y tratados con AOM/SSD sacrificados en la decimosexta semana del experimento (S16). A nivel de los péptidos, se observa principalmente una disminución de ET-1 en colon distal patológico. A nivel de los receptores, la pérdida de la significancia estadística, que se observó previamente, en la expresión génica de ET_A en colon distal, se debe a una disminución de su expresión en la patología. Si bien se redujeron las diferencias en la expresión génica de ET_A en colon proximal, estas siguen siendo significativas. Con respecto a la expresión génica de ET_B, también se redujeron las

diferencias entre colon distal normal y patológico, aunque en este caso se debe a un leve aumento en la patología. (nd: no detectable; * $p < 0,05$ diferencias estadísticamente significativas; ** $p < 0,01$ diferencias estadísticamente muy significativas). $X \pm SEM$, ($n=5$).

En el caso del receptor ET_B , los niveles de expresión génica en el colon proximal muestran una tendencia decremental no significativa, mientras que en el colon distal, si bien se observa que su expresión es significativamente menor que en el mismo segmento normal, estas diferencias se redujeron con respecto al estadio anterior, debido a un leve aumento (0,01 veces).

5.2.3.4 Análisis de inmunolocalización de las ET a la S16 posinducción

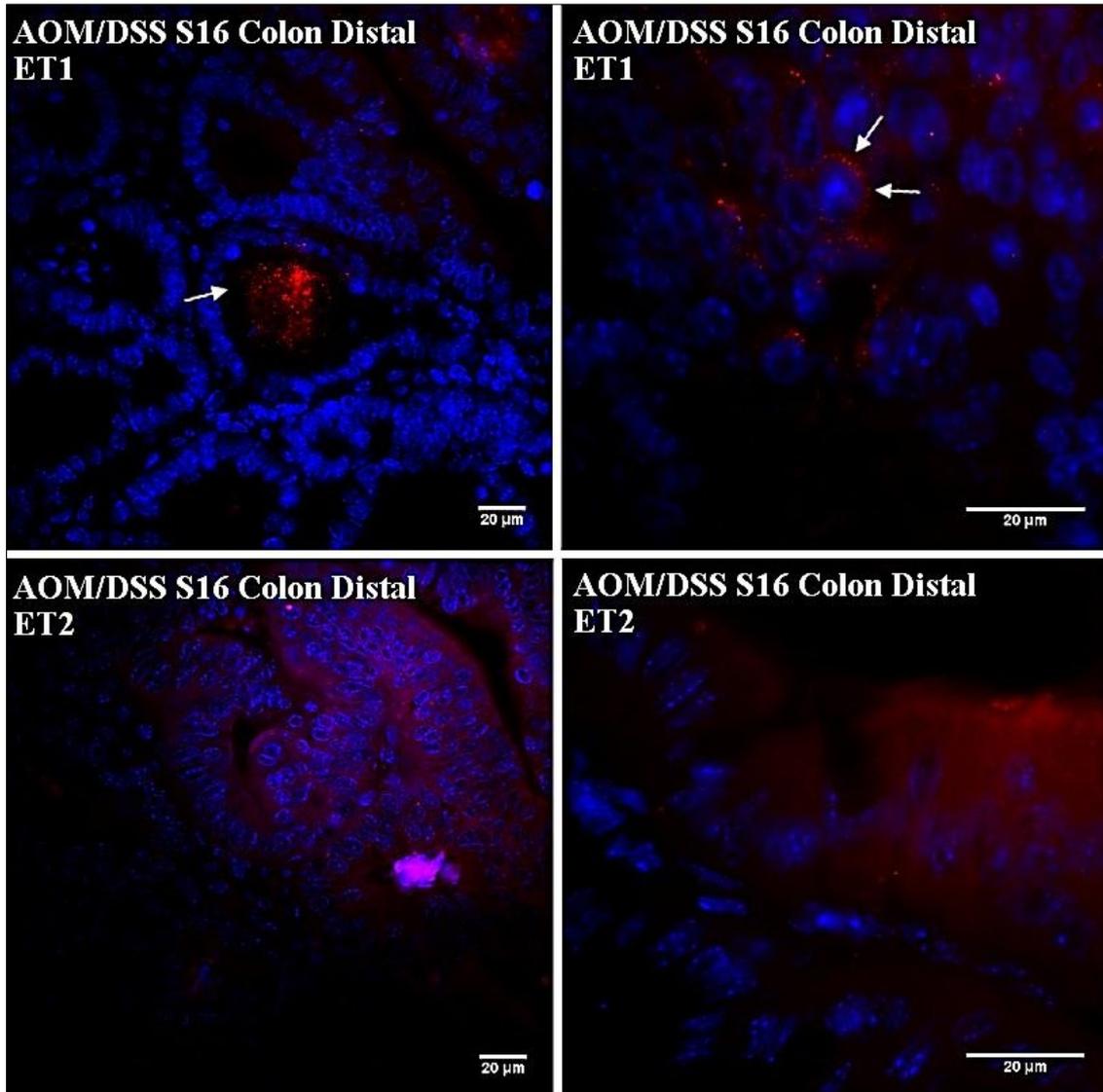


Figura 42. Imágenes representativas de la inmunolocalización de los péptidos ET-1 y ET-2 en colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la decimosexta semana del experimento (S16). La inmunoseñal de ET-1 se ubica en los restos celulares de las zonas de necrosis sucia y, como se observa en el estadio anterior, también se presenta rodeando los núcleos de células displásicas. Al igual que en el estadio anterior, la inmunoreacción de ET-2 no dio señal positiva.

La marcación para ET-1 en este estadio exhibe un patrón de localización muy similar al verificado en el anterior. En la Figura 42 se observa marcación de ET-1 en citoplasma de células displásicas, aunque con la aparición de zonas necróticas, también se evidencia marcación en las mismas. ET-2 tampoco pudo ser detectada en este estadio.

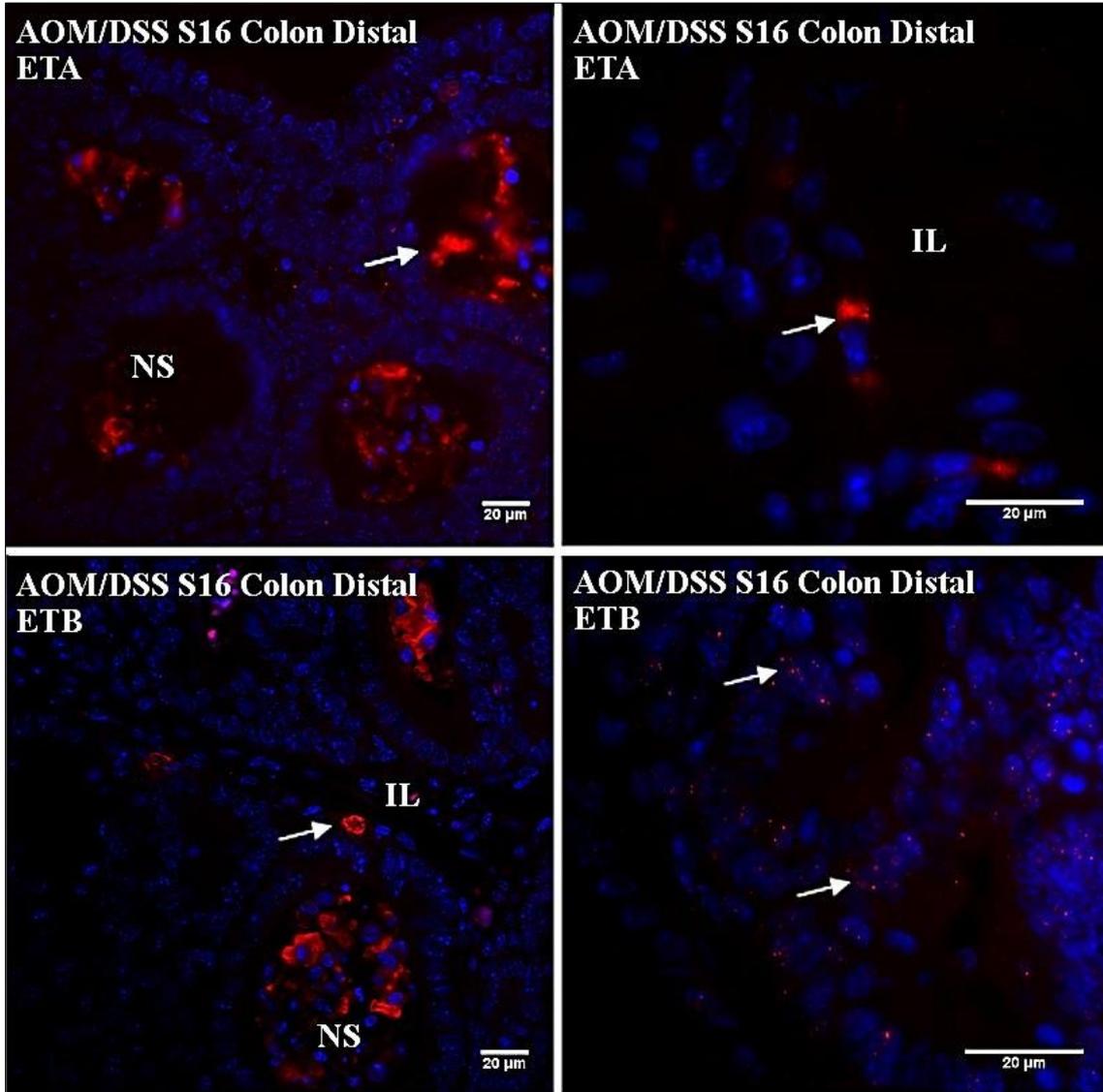


Figura 43. Imágenes representativas de la inmunolocalización de los receptores ET_A y ET_B en colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la decimosexta semana del experimento (S16). Se observa marcación de ET_A principalmente en los restos celulares necróticos (izquierda) y en citoplasma de células en infiltrados linfocitarios (derecha). La inmunolocalización de ET_B, se observa también en zonas necróticas, aunque localiza además en algunos núcleos de linfocitos (izquierda). A su vez, aunque leve, se observa marcación en núcleos de células con displasia de alto grado (derecha). IL: infiltrado linfocitario; NS: necrosis sucia.

Al igual que el ligando ET-1, los receptores presentaron similar marcación que la verificada en la S8. En la Figura 43 (derecha), se observa marcación de ET_A en el citoplasma celular y de ET_B en algunos núcleos displásicos. Sin embargo, también en este caso se observó señal de ET_A, ET_B

y ET-1 en las zonas necróticas sucias, las que no fueron visualizadas en los controles en los que se omitieron los anticuerpos primarios (Figura 44).

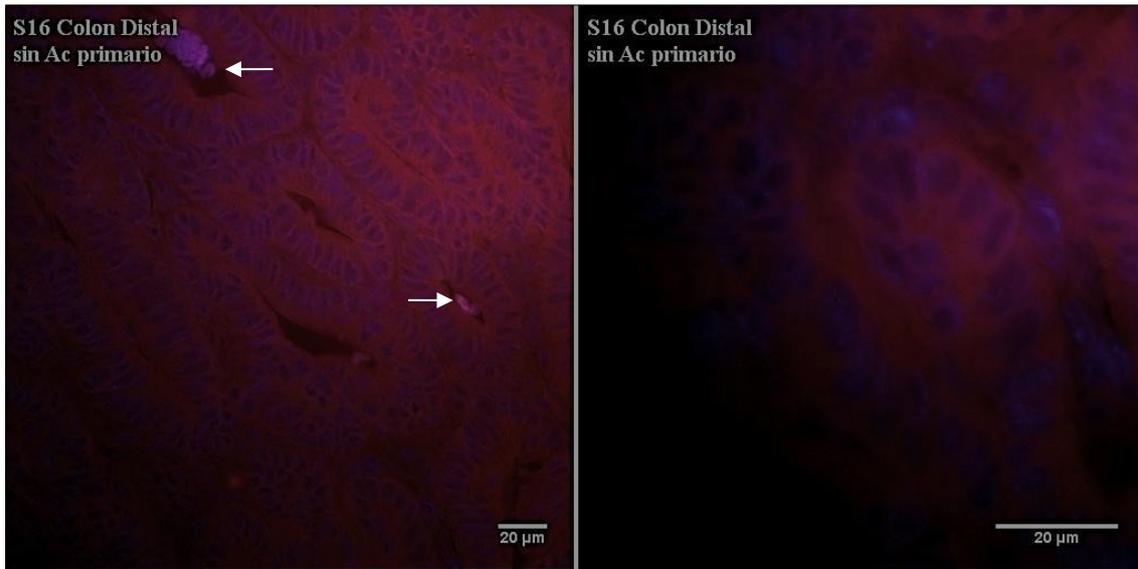


Figura 44. Reacción de inmunofluorescencia omitiendo el anticuerpo primario en colon distal de ratones tratados con AOM/SSD en la S16. Flechas: necrosis sucia.

5.2.3.5 Análisis de expresión génica e inmunolocalización de los péptidos natriuréticos la S16

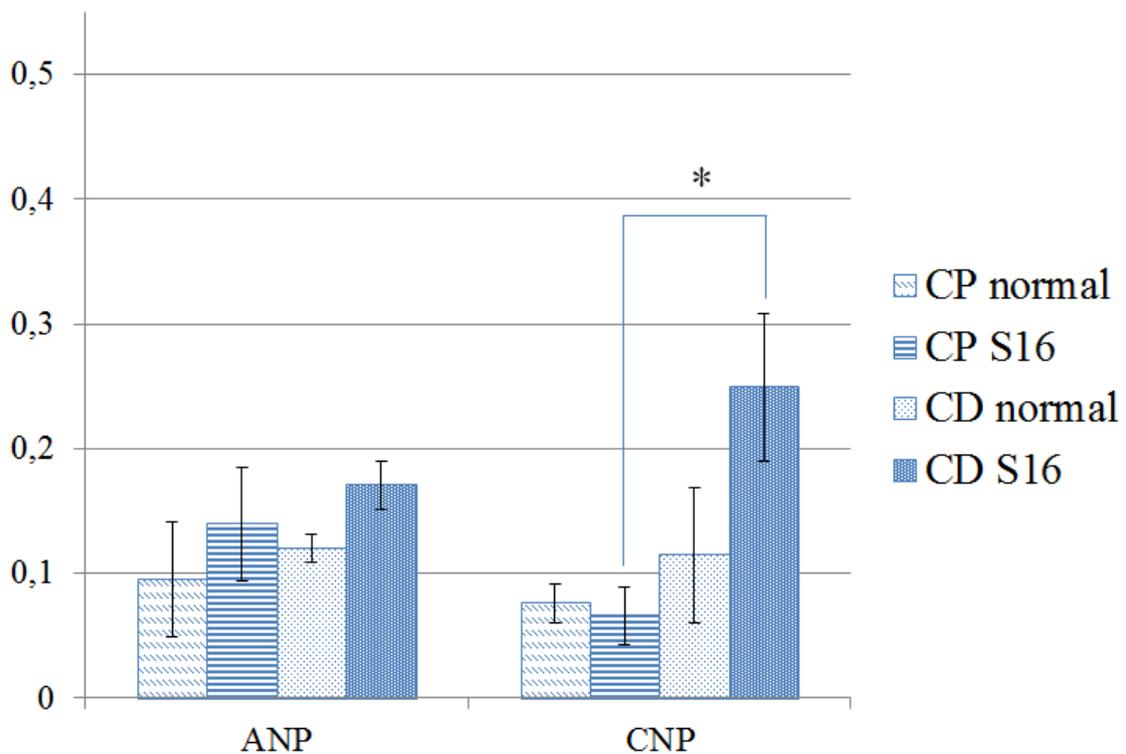


Figura 45. Expresión génica de los péptidos natriuréticos ANP y CNP relativa al gen B2M en colon proximal y distal de ratones normales y tratados con AOM/SSD, sacrificados a la decimosexta semana del experimento (S16). Se observan incrementos no significativos en la expresión de ANP en

colon proximal y distal, respecto al tejido normal. Por otra parte, se observa una pequeña disminución de la expresión génica de CNP en colon proximal y un marcado aumento de la misma en colon distal. (* $p < 0,05$ diferencias estadísticamente significativas). $X \pm SEM$, ($n=3$).

Como ocurre en la S4, en este estadio el ANP presenta niveles de expresión génica superiores a los verificados en los tejidos normales, tanto en el colon proximal (0,04 veces) como en el distal (0,05 veces) (Figura 45).

Por otra parte, y siguiendo la tendencia que se observa en el estadio anterior, el péptido CNP aumenta 0,13 veces su expresión en colon distal, en relación con los tejidos normales, aunque esta diferencia no resulta estadísticamente significativa. Sin embargo, los niveles de expresión de colon proximal y distal patológicos resultan en diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Figura 45).

En la Figura 46 se observa la localización de los péptidos natriuréticos en una zona displásica. El ANP exhibe una señal localizada y de alta intensidad en los núcleos de las células alteradas, presentes en los adenocarcinomas y en los núcleos de las células inflamatorias ubicados en el interior de éstos. El CNP, por su parte, exhibe una fuerte inmunomarcación citoplasmática, al parecer, circundando vesículas secretoras (Figura 46), aunque en ocasiones también se verifica localización nuclear (no mostrado). Como se describió para las endotelinas, también se visualiza señal fluorescente en los restos de necrosis sucia (no mostrado).

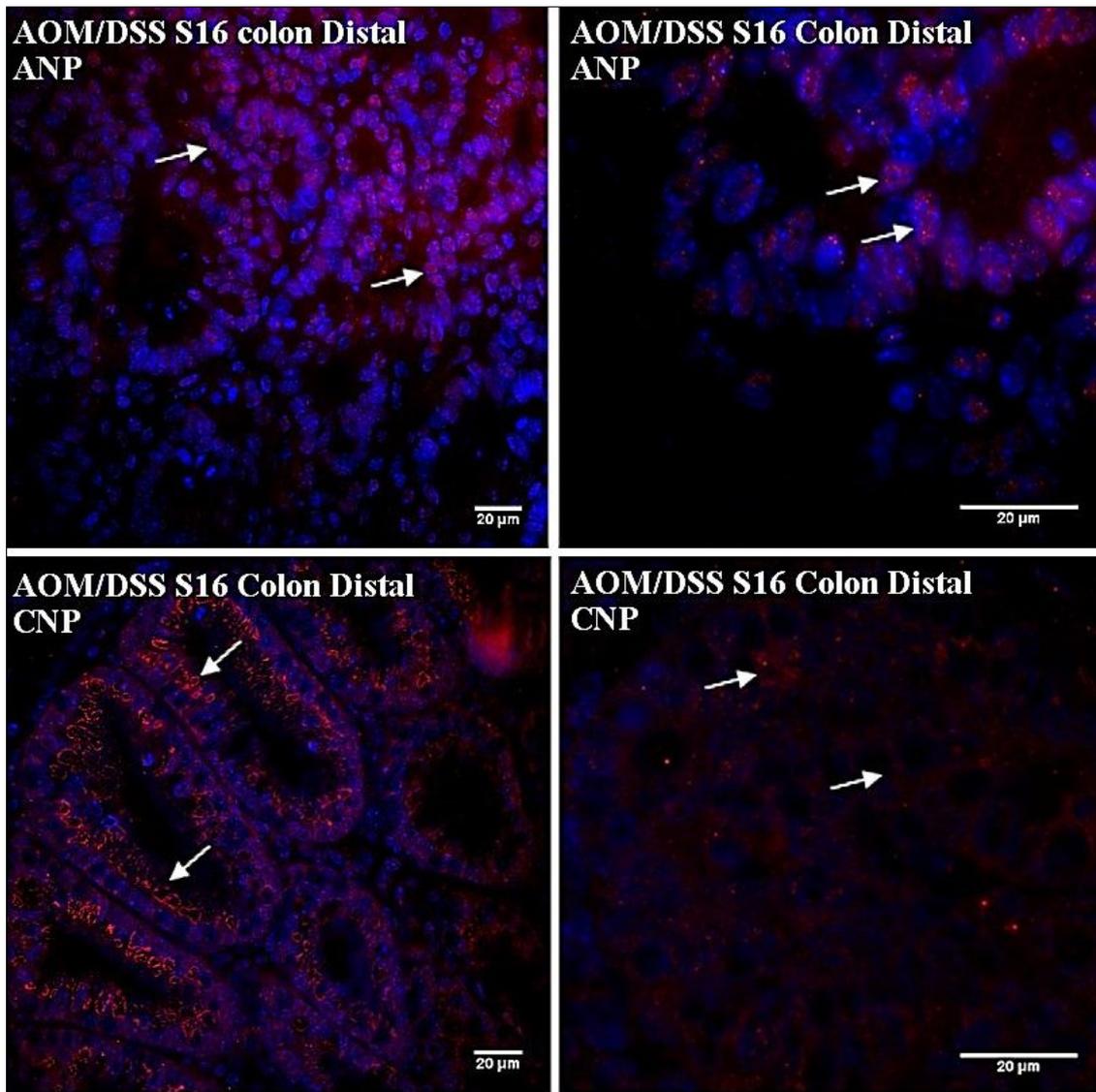


Figura 46. Imágenes representativas de la inmunolocalización de los péptidos ANP y CNP en colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la decimosexta semana del experimento (S16). Nuevamente, ANP presentó una marcación nuclear en el tejido afectado por la patología. En este caso, CNP exhibió marcación citoplasmática vesiculada.

Resumiendo los resultados de los animales tratados durante 16 semanas, en este estadio se verificaron características histopatológicas que se corresponden con los adenocarcinomas intramucosos. Adicionalmente, se visualizan zonas de lúmenes malignos fuertemente eosinófilos, frecuentemente combinados con restos de células necróticas. Las lesiones presentan las características de tumores pediculados y en menor proporción, sésiles de apariencia histológica muy variable, pudiendo ser tubulares, vellosas o tubulovellosas. Se identificó además un adenocarcinoma invasivo, localizado en el tallo de un adenoma pediculado. Al igual que en estadios previos, la orientación de las fibras colágenas, exhibió diferencias significativas comparado con el tejido normal. Con respecto a la expresión génica de las moléculas estudiadas, en colon distal los datos más relevantes fueron, que al silenciamiento de la expresión de ET-2 y

la significativa disminución de la expresión de ET_B, se suma la marcada la disminución de la expresión de ET-1 y el aumento significativo en la expresión de CNP. En el colon proximal, el dato más relevante, fue el aumento significativo de la expresión génica del receptor ET_A. Los principales sitios de inmunolocalización de endotelinas y péptidos natriuréticos en colon inducido por AOM/SSD se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 9. Se resumen las principales localizaciones de los péptidos vasoactivos en el colon murino de animales tratados por 16 semanas.

Péptidos y receptores	Localización tisular
ET-1	Este péptido se localiza principalmente en células epiteliales displásicas localizadas en los FCA, microadenomas y adenocarcinomas <i>in situ</i> , en linfocitos infiltrantes, en vasos sanguíneos de la submucosa. Principalmente citoplásmica y en ocasiones nuclear. Se observa además marcación en zonas necróticas.
ET-2	Nuevamente sólo puede observarse en las regiones inalteradas. Asume un patrón de distribución similar al verificado en los tejidos normales, esto es en la capa mucosa, principalmente en las células columnares de las criptas de Lieberkühn. Localización citoplásmica.
ET _A	Se verifica principalmente en células linfoides. La marcación resulta muy intensa en el citoplasma de linfocitos infiltrantes. Se observa además marcación en zonas necróticas.
ET _B	Distribución débil en las lesiones. Localización nuclear. También se observa inmunomarcación en las zonas necróticas.
ANP	Se verifica en el interior de los tumores y en linfocitos infiltrados. La inmunoseñal es principalmente nuclear.
CNP	Exhibe una fuerte inmunomarcación, fundamentalmente alrededor de las vesículas secretoras. La señal se da principalmente en el citoplasma de células glandulares y linfoides.

5.2.4 Vigésima semana del tratamiento con AOM/SSD

5.2.4.1 Análisis histológico

En la vigésima semana posterior a la inyección de AOM (S20), se verificó el aumento de tamaño de los tumores, aunque se conservan las características morfológicas que se describen en la S16. La diferencia más importante consiste en que en este estadio las células presentan menor grado de diferenciación y aumentan las zonas necróticas sucias (Figura 47A). Si bien estas características son propias de tumores invasivos, no se encontraron evidencias de este proceso más allá de la mucosa, por lo que la misma no pudo ser confirmada fehacientemente por el examen anatomopatológico. Las observaciones macroscópicas permitieron determinar que, en

este modelo, los tumores que se generan en colon distal, se expanden hacia colon proximal conforme progresa la enfermedad.

La tinción PAS/AA, permite confirmar lo observado en la S16, con una fuerte reducción en el número de células goblet. Sólo en algunas regiones tumorales se observan zonas necróticas, tanto PAS+ como AA+ (Figura 47B).

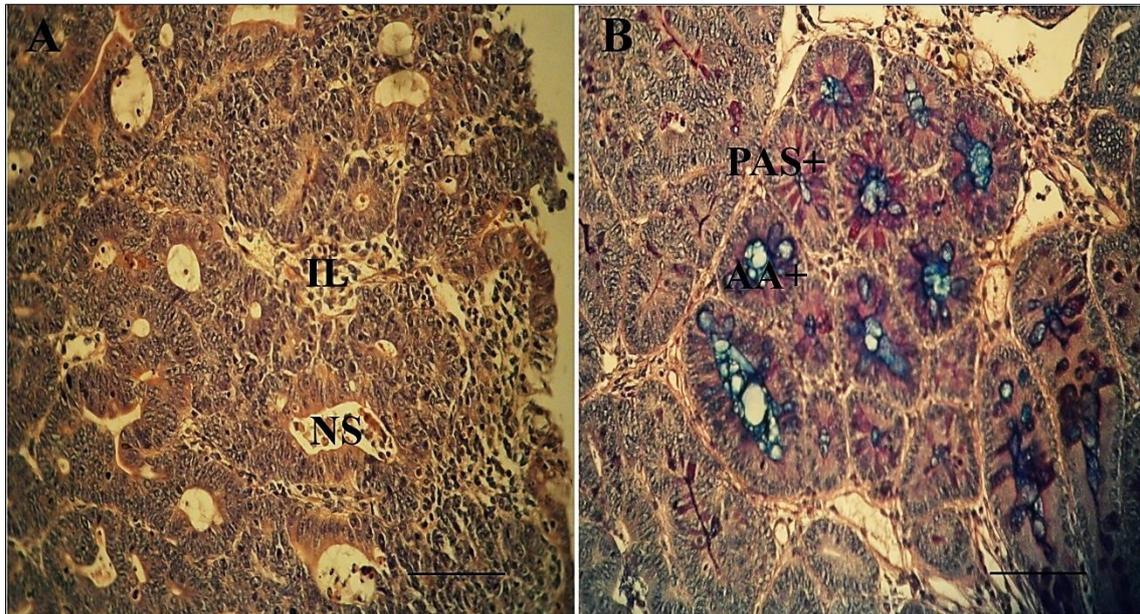


Figura 47. Imágenes representativas de cortes transversales de colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la vigésima semana del experimento. A) Tinción de H&E, se observa displasia de alto grado en un adenocarcinoma moderadamente diferenciado. B) Tinción de PAS/AA, se observan principalmente zonas AA+ y algunas mixtas. Barra = 50 μ m.

5.2.4.2 Análisis bidimensional cualitativo y cuantitativo del colágeno por MONL

Las imágenes representativas de H&E, TPEF y SGH de la S20, se muestran en la Figura 48. La observación de las imágenes permite corroborar que, al igual que lo observado en los estadios previos, en la vigésima semana posinducción se verifica un incremento de las fibras de colágeno de la submucosa. Pese a dicho incremento, la RA de los tejidos patológicos con respecto a los normales, mantuvieron valores semejantes a los observados en las semanas previas (Figura 48, FFT).

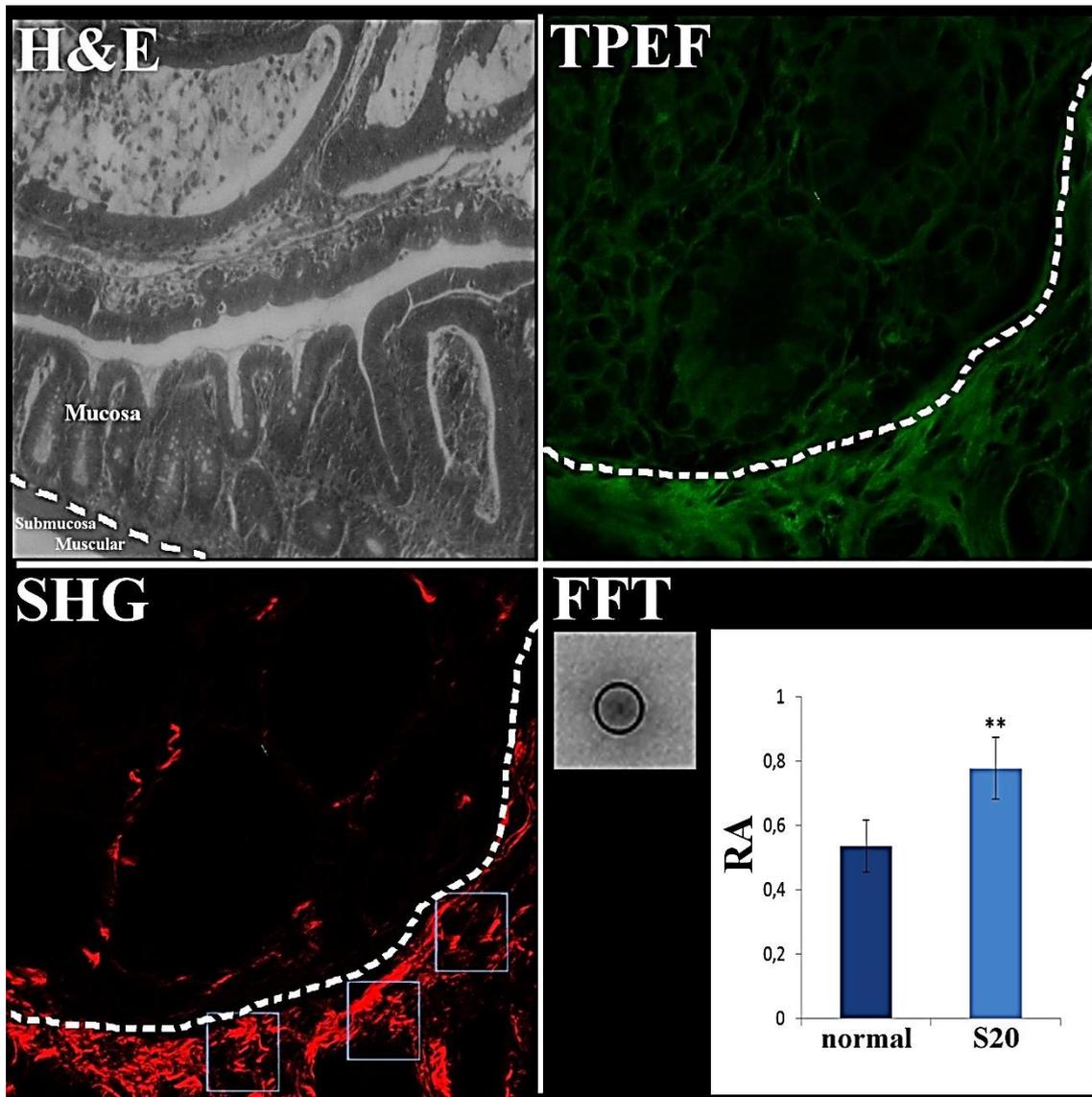


Figura 48. Imagen de H&E, TPEF y de SHG de un corte transversal de colon distal de ratón tratado con AOM/SSD, sacrificado a la vigésima semana del experimento (S20). En las imágenes se observan las capas: mucosa y submucosa, separadas por la muscular de la mucosa (línea punteada). También se muestra una imagen de la FFT de uno de los ROI y su ajuste elíptico, junto con el gráfico de la RA de ratones control y tratados (S20) ($n=5$).

5.2.4.3 Análisis de la expresión génica del sistema de las ET en la S20 posinducción

Los niveles de expresión de ET-1 en el último estadio experimental evaluado, no exhibieron diferencias remarcables con las observadas en la S16. Sin embargo, se verifica una tendencia decremental de los niveles de este péptido en el colon proximal. A nivel del colon distal, los niveles de ARNm de ET-1 resultan prácticamente idénticos a los observados en la S16, aunque con una mayor dispersión de los datos, por lo que no exhiben diferencias estadísticamente significativas (Figura 49).

En relación con ET-2, coincidiendo con la expansión del proceso tumoral, el hecho más remarcable es que sus transcritos resultan prácticamente indetectables también en el colon proximal.

Los niveles de expresión génica del receptor ET_A no exhiben cambios substanciales, respecto a los observados en la S16. Por otro lado, la expresión de ET_B en el colon proximal muestra un aumento de 0,08 veces, lo que ubica su valor medio muy cercano al verificado en el tejido normal, mientras que la media en el colon distal patológico es inferior a la observada en el mismo segmento normal, aunque no se verifican diferencias estadísticamente significativas.

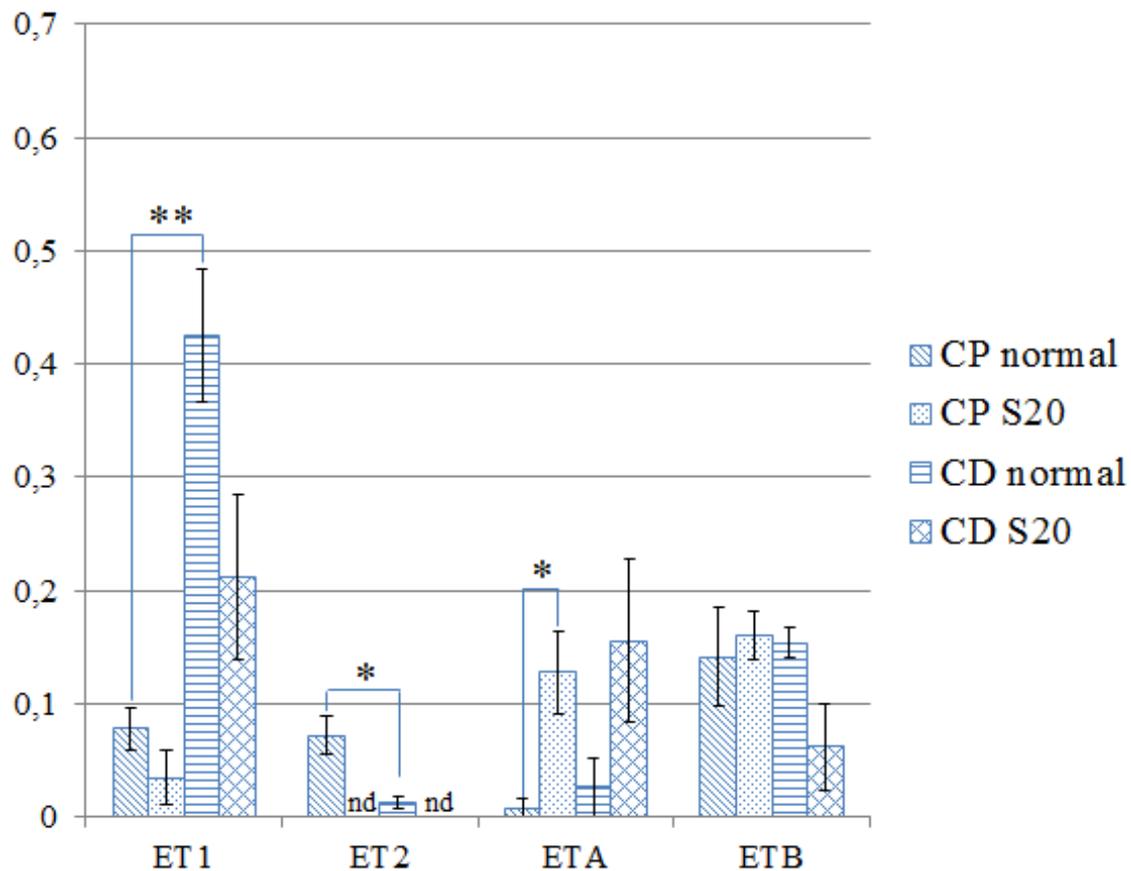


Figura 49. Expresión génica de ET-1, ET-2, ET_A y ET_B relativa al gen B2M en colon proximal y distal de ratones normales y tratados con AOM/SSD sacrificados en la vigésima semana del experimento (S20). ET-1 muestra la misma tendencia que registra en la S16, a disminuir su expresión, aunque por la dispersión de los datos no se observan diferencias significativas. ET-2, a su vez, muestra una disminución en su expresión génica en colon proximal tal que, en este estadio, no puede ser detectada. El receptor ET_A presenta valores similares a los del estadio anterior. El receptor ET_B muestra en colon proximal un valor medio de expresión génica similar al del tejido normal, mientras que en colon distal la media es inferior a la del tejido normal, aunque las diferencias no son significativas. (nd: no detectable; * $p < 0,05$ diferencias estadísticamente significativas; ** $p < 0,01$ diferencias estadísticamente muy significativas). $X \pm SEM$, ($n=5$).

5.2.4.4 Análisis de inmunolocalización de las ET en la S20 posinducción

Como puede observarse en la Figura 50, en este estadio ET-1 exhibe una marcación similar a la observada en los estadios precedentes, principalmente en el citoplasma de células displásicas, mientras que ET-2, no es detectada. Con el avance de la patología, como se mencionó previamente, se observa una expansión maligna hacia colon proximal. Además, dado que ET-2 en este estadio deja de ser detectable también en el segmento proximal, se realizó un análisis de inmunofluorescencia para ésta isoforma en éste siendo la misma indetectable (imagen no mostrada).

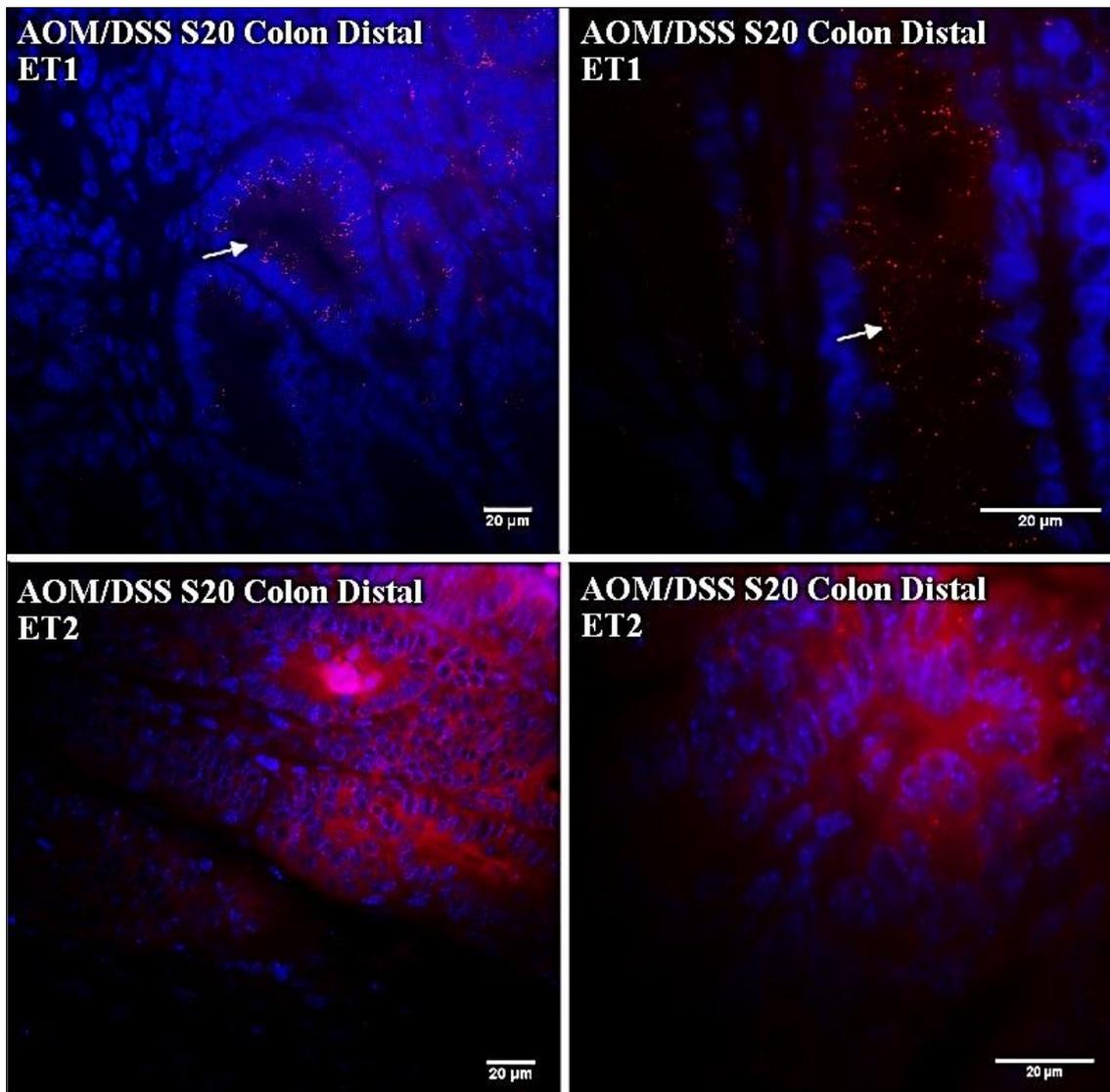


Figura 50. Imágenes representativas de la inmunolocalización de los péptidos ET-1 y ET-2 en colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la vigésima semana del experimento (S20). La inmunoseñal de ET-1, al igual que en estadios anteriores, aparece en el citoplasma de células con displasia de alto grado. La señal de ET-2 no pudo ser detectada.

Ambos receptores exhiben un patrón de localización similar a la S16, aunque la marcación parece localizarse en un menor número de células displásicas e incrementarse en restos necróticos y células infiltrantes (Figura 51).

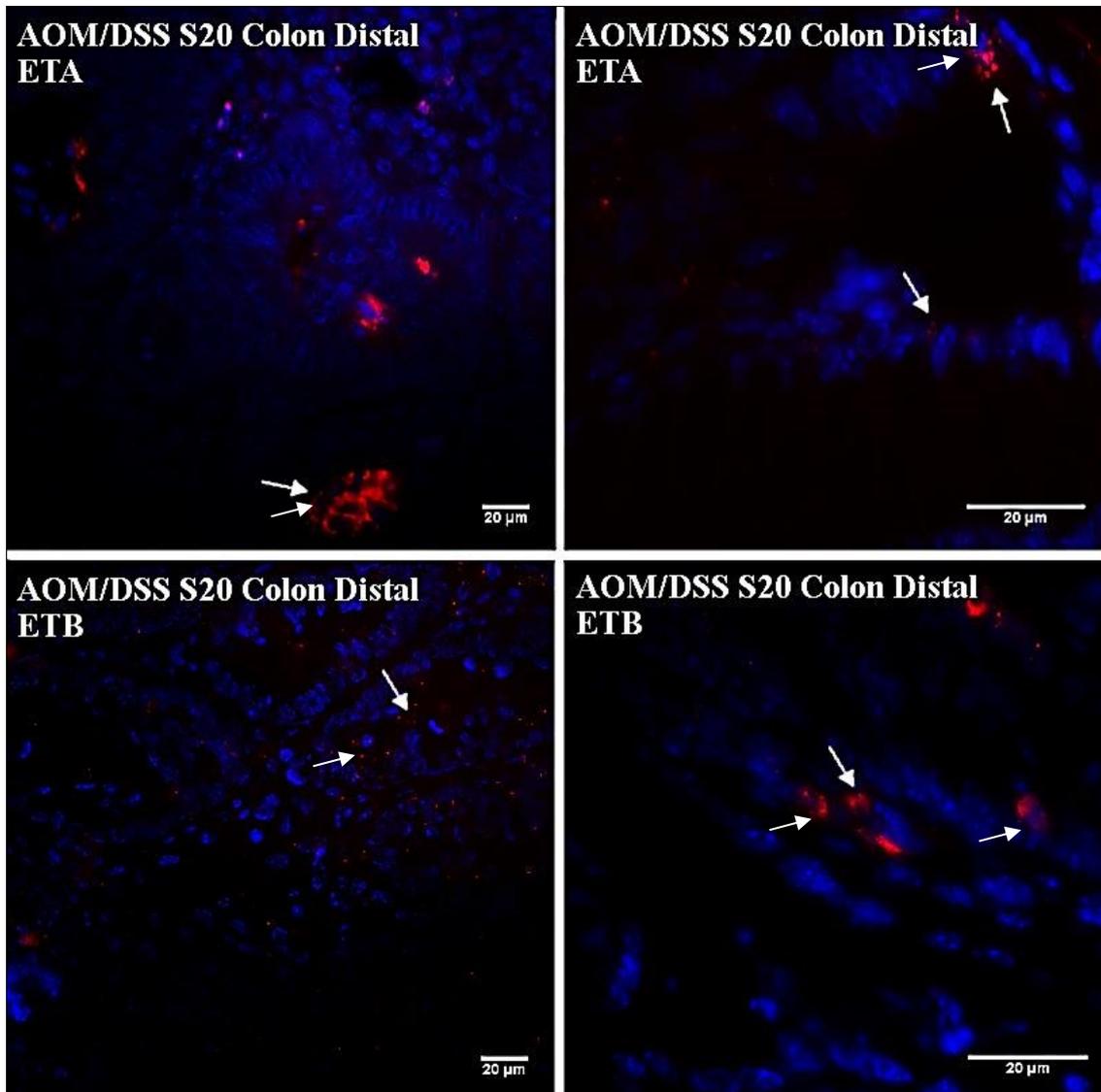


Figura 51. Imágenes representativas de la inmunolocalización de los receptores ET_A y ET_B en colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la vigésima semana del experimento (S20). ET_A aparece localizada principalmente en zonas necróticas y en células de infiltrado linfóide, la señal en células displásicas es escasa. ET_B se observa levemente localizada en citoplasma (izquierda) y en núcleos (derecha) de algunas células displásicas.

5.2.4.5 Análisis de expresión génica e inmunolocalización de los péptidos natriuréticos en la S20

En la Figura 52 se resume la expresión génica de los péptidos natriuréticos en este último estadio. Se observa que la expresión génica de ANP no se modificó significativamente durante el experimento.

Por otra parte, la expresión génica de CNP se vio claramente modificada durante el desarrollo del cáncer, principalmente en colon distal. En la S20, la expresión génica de CNP aumenta 0,33 veces en colon distal y disminuye 0,03 veces en colon proximal, respecto a los mismos segmentos normales. Este comportamiento sigue la tendencia del estadio anterior, en el que se observan diferencias significativas entre colon proximal y distal patológicos, aunque es en la S20 en el que éstas diferencias se acentúan, mostrando además significatividad estadística ($p < 0,05$) entre los segmentos del colon distal normal y el patológico.

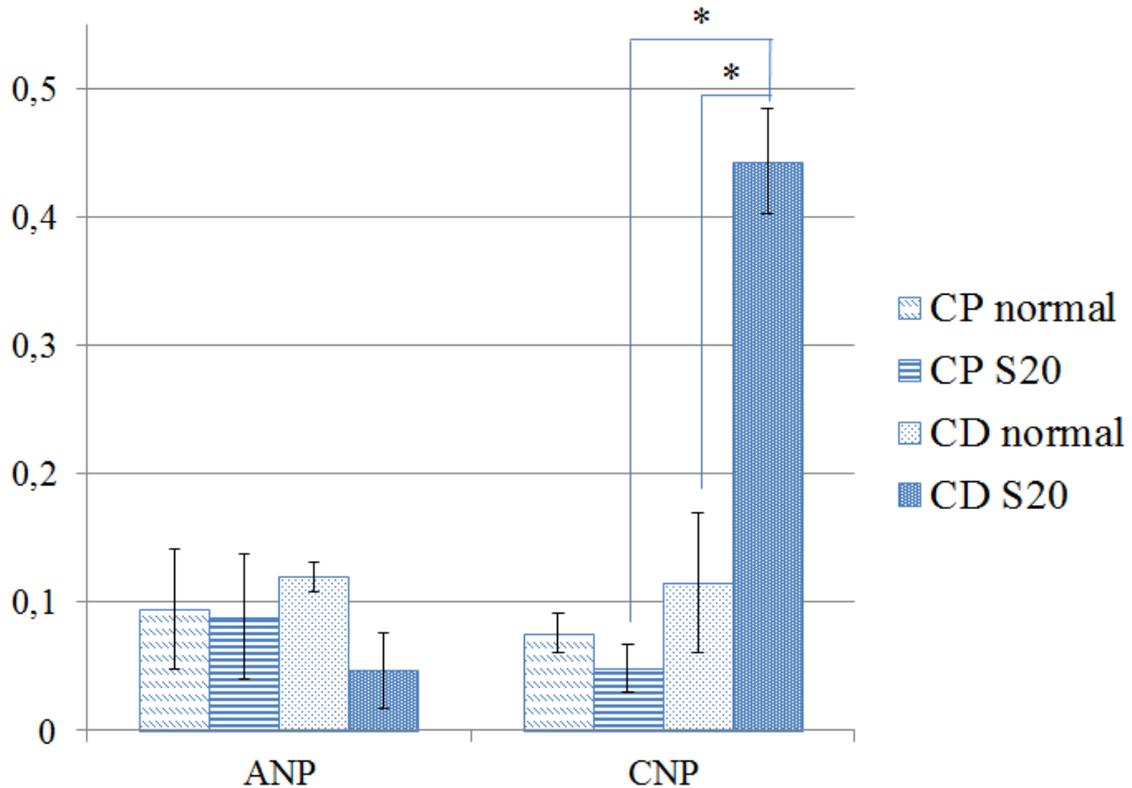


Figura 52. Expresión génica de los péptidos natriuréticos ANP y CNP relativa al gen B2M en colon proximal y distal de ratones normales y tratados con AOM/SSD, sacrificados a la vigésima semana del experimento (S20). Mientras la expresión génica de ANP no presenta cambios significativos respecto a estadios anteriores, se observa un marcado incremento en la expresión génica de CNP en colon distal. (* $p < 0,05$ diferencias estadísticamente significativas). $X \pm SEM$, (n=3).

Si bien la localización de ambos péptidos natriuréticos fue muy similar en todo el desarrollo de la patología, en este estadio éstos exhibieron un marcado incremento en los carcinomas y en zonas adyacentes a los mismos, como puede verse en la Figura 53.

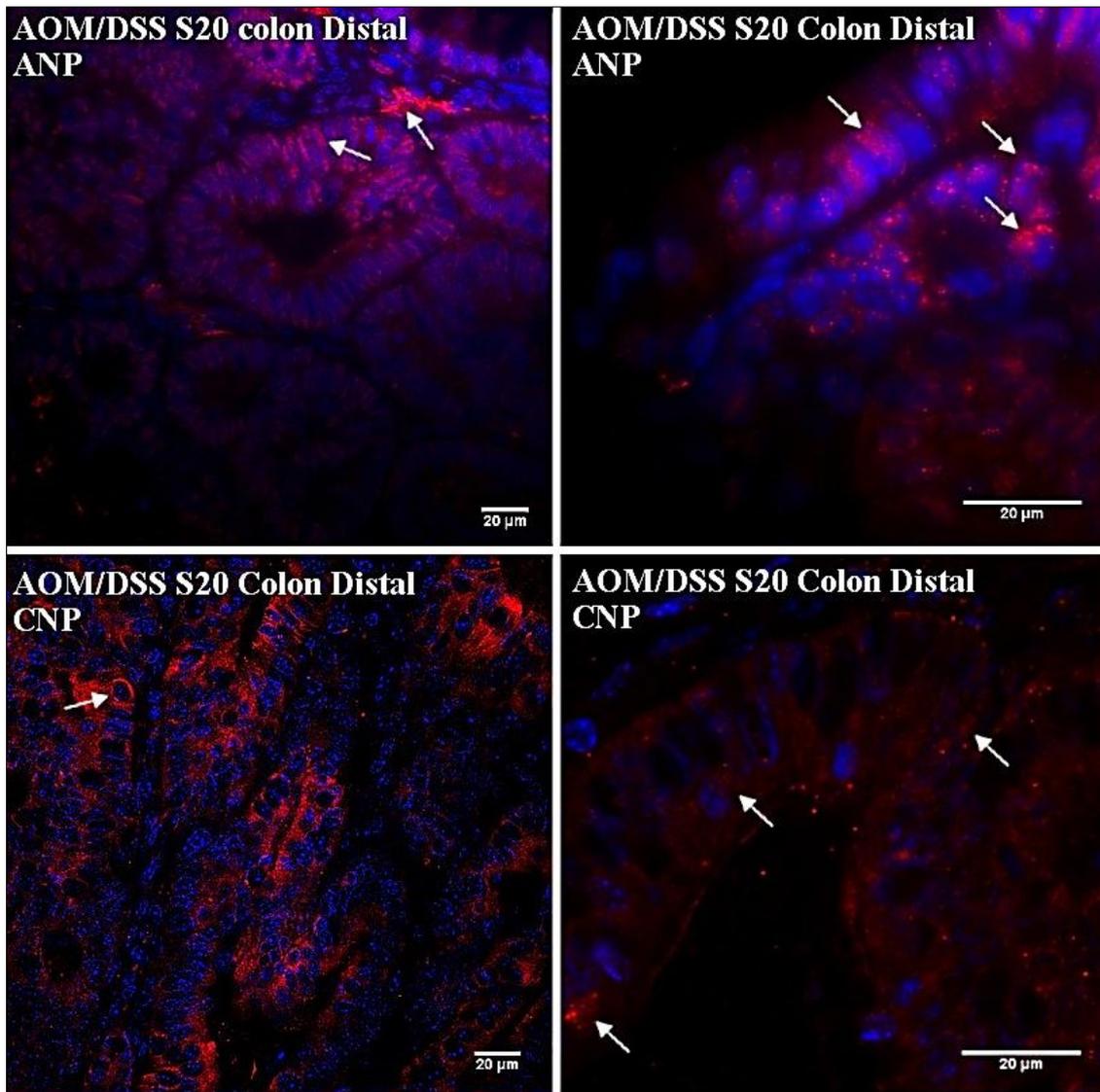


Figura 53. Imágenes representativas de la inmunolocalización de los péptidos ANP y CNP en colon distal de ratones tratados con AOM/SSD, sacrificados a la vigésima semana del experimento (S20). La marcación de ANP se intensifica en el tejido a medida que aumenta su desdiferenciación, se visualiza preferentemente en células displásicas, aunque también se observa en células inflamatorias. La marcación de CNP también parece estar intensificada en citoplasma de células displásicas.

Sintetizando los principales hallazgos del último estadio estudiado, se verificó el aumento de tamaño de los tumores. Las células exhiben menor grado de diferenciación y aumentan las zonas necróticas sucias, las cuales son características propias de los tumores invasivos, aunque no se encontraron evidencias de este proceso más allá de la mucosa, por lo que la misma no pudo ser confirmada. Las observaciones macroscópicas permitieron determinar que los tumores generados en colon distal, se expandieron hacia colon proximal. Al igual que en estadios previos, la orientación de las fibras colágenas, presentó diferencias significativas comparado con el tejido normal. En colon distal, además del silenciamiento sostenido de ET-2 desde la cuarta semana del tratamiento, el dato más relevante fue el incremento sostenido de la expresión de CNP, y por el contrario, los bajos niveles de expresión de ET_B y ET-1. Por su parte ET_A,

exhibe niveles más elevados, aunque no son estadísticamente significativos. En el colon proximal, el dato más relevante, fue que conforme avanza el proceso tumoral, se produce el silenciamiento de ET-2. Los principales sitios de inmunolocalización de endotelinas y péptidos natriuréticos en colon inducido por AOM/SSD se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 10. Se resumen las principales localizaciones de los péptidos vasoactivos en el colon murino de animales tratados por 20 semanas.

Péptidos y receptores	Localización tisular
ET-1	Además de las localizaciones clásicas (células epiteliales displásicas de los FCA, microadenomas y adenocarcinomas <i>in situ</i>), también se puede detectar en linfocitos infiltrantes, en vasos sanguíneos de la submucosa. La inmunomarcación es principalmente citoplásmica, aunque en ocasiones se verifica señal a nivel nuclear. Se observa además, marcación en zonas necróticas.
ET-2	Sólo en las regiones en las que no se verifican alteraciones morfológicas significativas. Asume un patrón de distribución similar al verificado en los tejidos normales, esto es en la capa mucosa, principalmente en las células columnares de las criptas de Lieberkühn. Localización citoplásmica.
ET _A	Se verifica principalmente en células linfoides. La marcación resulta muy intensa en el citoplasma de linfocitos infiltrantes. Se observa además marcación en zonas necróticas.
ET _B	Distribución débil en las lesiones. Localización nuclear. Se observa además marcación en zonas necróticas.
ANP	Se verifica fuerte marcación en el interior de los tumores, zonas adyacentes y en linfocitos infiltrados. Marcación principalmente nuclear.
CNP	Exhibe una fuerte inmunomarcación, al parecer, circundando vesículas secretoras. Principalmente en el citoplasma de células glandulares y linfoides.

6. Discusión y conclusiones

Previo a discutir los resultados de esta tesis, resulta de interés realizar una breve contextualización del rol de los endotelios en los metazoos, en tanto este tejido es el principal productor de estos péptidos vasoactivos. Desde los celentéreos a los organismos superiores, un aspecto notable es que, contrariamente a lo que ocurre en los invertebrados, los endotelios están presentes prácticamente en todas las especies de vertebrados. Este hecho, es uno de los indicios que permiten postular que los endotelios evolucionaron de un antepasado común de los vertebrados, luego de producida la divergencia entre los urocordados y cefalocordados hace unos 500 millones de años, durante un período de sólo 50 millones de años. Este relativamente corto período de tiempo, fue asimismo testigo de la evolución de la circulación cerrada, de la cascada de la coagulación y de la inmunidad adquirida [203].

Los vasos de los invertebrados están siempre revestidos de matriz extracelular. Sólo los vertebrados poseen un revestimiento endotelial verdadero, definido como una capa de células epiteliales que expresan polaridad basoapical (con la superficie apical orientada hacia la luz de los vasos), las uniones intercelulares y el anclaje a la membrana basal. Los vasos sanguíneos de algunos invertebrados, incluyendo cefalópodos, anélidos y anfioxos tienen células adheridas a la superficie luminal, por encima de la membrana basal. Estas células a veces se han denominado "células endoteliales" [204]–[207]. Sin embargo, éstas forman un revestimiento incompleto, carecen de las uniones intercelulares típicas de las células endoteliales de los vertebrados y rara vez aparecen unidas a la lámina basal subyacente. Así, este tipo de células serían amoebocíticas y es probable que representen un tipo de hemocito circulante, que podría o no ser un precursor evolutivo de la célula endotelial.

El endotelio forma el revestimiento celular interno de los vasos sanguíneos. Las células endoteliales son muy activas metabólicamente y juegan un papel crítico en muchos procesos fisiológicos fundamentales, entre los que se destacan el control del tono vasomotor, el tráfico de células sanguíneas entre la sangre y el tejido subyacente, el mantenimiento de la fluidez sanguínea, la permeabilidad, la angiogénesis y la inmunidad innata y adaptativa. También se reconoce que el endotelio está involucrado en la mayoría, si no en todos los estados patológicos, ya sea como determinante primario de la fisiopatología o como víctima de los daños colaterales provocados por ésta.

Desde un punto de vista evolutivo, resulta importante intentar dilucidar qué fuerzas selectivas fueron responsables de la aparición del endotelio en los vertebrados ancestrales. Algunos autores sugieren que el revestimiento liso proporcionado por el endotelio les confirió a los seres vivos la capacidad de minimizar la energía requerida para movilizar la sangre. Así, una de las funciones claves del endotelio habría sido la de actuar mediando el control vasomotor de los

vertebrados más antiguos. Por lo tanto, la aparición del endotelio puede haber proporcionado una nueva etapa crítica en los mecanismos de los procesos de vasorregulación, permitiendo sistemas más altamente presurizados. Adicionalmente, la función de barrera proporcionada por el endotelio habría impedido la pérdida de proteínas plasmáticas necesarias para mantener el equilibrio entre las presiones osmótica e hidrostática [208]. Así, presiones más altas habrían requerido no sólo mayores presiones osmóticas, sino también la formación del sistema linfático destinado al drenaje del excedente neto de líquido intersticial. En paralelo, los vertebrados ancestrales también habrían desarrollado nuevos mecanismos inmunológicos y de coagulación. Por lo tanto, la coevolución del endotelio durante esta relativamente estrecha ventana temporal puede explicarse, en parte, por el papel de las células endoteliales en la localización de estas actividades en las zonas requeridas [209]. Adicionalmente, se ha demostrado que las células endoteliales desempeñan un papel fundamental en el desarrollo temprano de órganos, tales como el páncreas y el hígado [210]. Tal diálogo bidireccional entre el endotelio y otros tejidos puede haber sido instrumental en la evolución de la formación de esta capa celular.

Otra incógnita sobre la que se ha especulado es acerca de cuál habría sido el origen de las células endoteliales. Una posibilidad es que éstas habrían surgido a partir de las células mesoteliales. Alternativamente, las células endoteliales podrían derivar de los amebocitos, a través de la adquisición de un fenotipo epitelial [209], [211]. Estudios previos demostraron que los amebocitos de larvas de *Anphioxus* expresan *Pdvegfr* (un miembro de la subfamilia del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas [PDGFR]/receptor del factor de crecimiento endotelial vascular [VEGFR]) [212]. Estos autores propusieron que las células endoteliales de los vertebrados podrían haber derivado de las células hemales libres ancestrales *Pdvegfr*⁺ [212]. La postulación del origen amebocítico de las células endoteliales se ve soportada por el hecho que las células endoteliales aparecen en estrecha asociación con las células hematopoyéticas. Ambas tienen células progenitoras comunes (hemangioblastos) y algunas células hematopoyéticas derivan del endotelio hemogénico.

Después de comprenderse que las células endoteliales son importantes reguladores vasculares, inmunológicos y probablemente de muchas otras funciones, la biología celular endotelial se ha expandido rápidamente dando lugar a una disciplina de gran complejidad y absolutamente distinta a cómo se concebía hasta hace unos pocos años. En los últimos años, se han identificado numerosos factores endoteliales los cuales se sabe ahora son importantes en la regulación del tono vascular, incluyendo sustancias promotoras de la relajación o de la contracción, tales como prostaciclina, óxido nítrico y en un lugar especial, las endotelinas.

Al presente, y coincidentemente con lo expresado precedentemente en relación con los endotelios, no se han podido identificar componentes del sistema de las endotelinas fuera de los

vertebrados [213], [214]. Por el contrario, los genes que codifican las proteínas G asociadas con los receptores de endotelinas, así como las enzimas de conversión de la endotelina (ECE), predatan el linaje de los vertebrados [213], [215]–[217]. Hasta el presente, no se han encontrado genes de preproendotelina en linajes previos a peces teleósteos y tetrápodos [213], [214]. Más aún, usando búsquedas Blast (PHI-Blast) no se ha encontrado dominio de endotelinas en los genomas de urocordados, de *Amphioxus* [218] o de invertebrados más distantes [219].

Por el contrario, Braasch y col. (2009) encontraron varios dominios de endotelina en agnatos tan primitivos como la lamprea [218]. Sin embargo, su presencia en estos organismos sugiere que las endotelinas son una innovación de los vertebrados que surgió luego de producida la divergencia de los protocordados, que precede la aparición de gnatostomados.

Las endotelinas, en función de su expresión generalizada en los endotelios vasculares, tienen una presencia que prácticamente abarca la totalidad de los órganos del cuerpo [220]; [221]. En el tracto gastrointestinal, si bien se ha reportado la presencia de estos péptidos y sus receptores, poco se ha avanzado en el conocimiento de su rol en las distintas regiones del tubo digestivo en general y del colon en particular. A pesar de que usualmente se lo considera un órgano uniforme, ahora se sabe que las distintas regiones del mismo poseen funciones muy específicas. El colon es un órgano de conservación, es el responsable de la recuperación del agua, los electrolitos y la energía. La organización de la función colónica está determinada por el papel desempeñado por la flora luminal, la función de los diferentes tipos de células epiteliales mucosas, las células inmunocompetentes y la neuromusculatura. Estos componentes del colon interactúan entre sí y con la flora colónica, así como diferentes áreas del colon cumplen distintas funciones [222]. La presente tesis, constituiría el primer trabajo en el que se reporta la expresión génica de estos péptidos y sus receptores, así como de sus posibles antagonistas, los péptidos natriuréticos en los distintos sectores del colon murino en el contexto de esta disparidad funcional.

Debido a que la información respecto a la acción de las endotelinas en el colon en su mayor parte está focalizada en su efecto potenciador del desarrollo de procesos tumorales, en este trabajo se realizaron estudios relacionados con las endotelinas y los péptidos natriuréticos durante el desarrollo del cáncer colorrectal inducido químicamente empleando azoximetano (AOM), un metabolito carcinogénico de la 1,2-dimetilhidrazina (DMH) [223]. En este sentido, la presente tesis constituye el primer reporte en el que se realiza una caracterización histológica clásica, combinada y complementada con técnicas de microscopía óptica no lineal. Asimismo, se analizan conjuntamente las modificaciones de la expresión génica del sistema de las endotelinas en animales normales y durante la ontogenia tumoral colorrectal.

Dado que en los estudios preliminares se verificó que, en este modelo experimental los tumores se encuentran localizados en el colon distal, los análisis de la expresión génica del sistema de endotelinas en este segmento, fue complementada con la de técnicas de inmunofluorescencia para revelar la localización de los péptidos y sus receptores, tanto en colon normal como en las distintas etapas del proceso canceroso.

El análisis histológico permitió la identificación y caracterización de las lesiones de cada estadio, de acuerdo a los parámetros establecidos por Tanaka y colaboradores [1]. Adicionalmente, el análisis basado en microscopia no lineal permitió identificar los cambios en la organización de las fibras colágenas, fundamentalmente en los primeros estadios del cáncer, los que son indicadores de lesiones tempranas y se proponen como potenciales herramientas diagnósticas de alerta del cáncer colorrectal.

6.1 Estudios en el colon en condiciones fisiológicas normales

6.1.1 El sistema de las endotelinas

Pese a que la morfología de la mucosa normal del colon exhibe una apariencia homogénea, dicha estructura presenta sutiles diferencias que le permiten sostener el conjunto de funciones características de protección, secreción y absorción, así como albergar subsistemas inmunológicos muy desarrollados y especializados. En una primera etapa, se verificó que los niveles de los ARNm de ET-1 y ET-2 muestran una distribución diferencial a lo largo del órgano. Así, la expresión génica de ET-1 exhibe niveles significativamente elevados en el segmento distal del colon, respecto a los verificados en el segmento proximal. Por el contrario, los niveles de expresión de ET-2 verificados resultan prácticamente opuestos, con valores superiores en este último segmento. En relación con los receptores de las ET, ambos segmentos muestran niveles de expresión semejantes. Como se describió en la introducción, estudios previos han detectado niveles de expresión génica de estos péptidos y sus receptores en el colon, sin embargo, este constituye el primer trabajo en el que se discriminan los niveles de expresión génica en los diferentes segmentos del órgano normal.

La presencia de receptores ET_A y ET_B en el intestino fue originalmente informada utilizando el ensayo de unión de [¹²⁵I]-ET-1 sobre ambos receptores, en secciones de tejido [224][225]. En dichos estudios y en coincidencia con lo observado en el colon humano [74], los autorradiogramas del receptor demostraron que los sitios de unión de [¹²⁵I]-ET-1 son abundantes en los plexos mientérico y submucoso. Adicionalmente, en el trabajo de Yoshimura y colaboradores, se demostró que, en el plexo mientérico, la incubación con ET-1 sin marcar, así como el agonista de ET_B (IRL 1620), o el antagonista del receptor ET_B (BQ788) son capaces de abolir la unión de [¹²⁵I]-ET-1, pero esto no ocurre con el antagonista del receptor ET_A (BQ123),

indicando que el receptor de endotelina localizado en las neuronas mientéricas es del tipo ET_B [225]. En el mismo trabajo, ET-1 (10^{-1} - 3×10^{-8} M) y ET-3 (10^{-1} - 3×10^{-8} M) evocaron el flujo de ³H de las preparaciones del músculo longitudinal del plexo mientérico del ileum precargados con [³H]-colina, en un modo dependiente de la concentración. En dicho trabajo, los péptidos no exhibieron diferencias significativas en relación con dicho efecto. Asimismo, el flujo evocado de ³H resultó sensible a BQ788 pero insensible a BQ123.

Trabajos posteriores utilizando, técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia permitieron describir la distribución de los componentes del sistema en el colon murino [70], [226]. En el presente trabajo, y en coincidencia con los estudios precitados, se demostró que el receptor ET_A se encuentra localizado en las capas mucosa y muscular, incluyendo el plexo mientérico; aunque también se detectó marcación en células linfoides. En la capa mucosa se visualizó inmunomarcación citoplasmática y aparentemente en vesículas secretoras. Adicionalmente, también se encontró reacción positiva en el borde apical de las células columnares de las criptas y sólo en algunos casos se pudo verificar marcación nuclear (Figura 54). Bkaily y colaboradores, utilizando células cardíacas y vasculares, mostraron la presencia de receptores ET_A y ET_B en la membrana plasmática, en el citosol, en la cubierta nuclear y en el nucleoplasma [227]. El patrón de ET_B fue principalmente nuclear (Figura 54), lo que guarda correspondencia con lo descrito en dichos trabajos. Un dato destacable es que, en contraste con ET_A, la densidad de ET_B fue mayor en el núcleo que en el citosol en todos los tejidos donde se verificó señal inmunopositiva. Estos hallazgos resultan coincidentes con los de Bkaily y colaboradores, quienes observaron resultados similares en todos los tipos de células humanas en las que se realizaron estudios por inmunofluorescencia [227]. Se ha postulado que dichos receptores inducidos por ET-1, promoverían del incremento en las concentraciones de Ca⁺ citosólico y nuclear; este catión libre ha sido asociado con un incremento de las especies reactivas del oxígeno en ambos compartimientos.

Este patrón de distribución de los receptores es consistente con el de ET-1 y ET-2. La localización de ET-1 en colon distal es coincidente con los hallazgos previos [70]. En la capa mucosa, se ha postulado que ET-1 podría actuar como factor paracrino, autocrino e incluso intracrino [226]. En este trabajo se encontró la inmunomarcación de este péptido y la de sus receptores (principalmente ET_B), en los núcleos de células epiteliales y musculares sugiriendo que dichas células son blancos potenciales de las endotelinas. Por otra parte, ET-2 sólo se encuentra expresada en el citoplasma de las células linfoides y en las células columnares de las criptas de Lieberkühn. En colon proximal, su distribución no exhibió un patrón uniforme en las criptas, constituyendo el presente reporte, el primer antecedente de su inmunolocalización en este segmento. Por el contrario, en el colon distal, la inmunomarcación se localizó casi

exclusivamente en el tercio inferior de las criptas (Figura 54), en contraposición a lo hallado por Adur [70], en el colon de ratones normales.

6.1.2 Péptidos natriuréticos

En paralelo a los estudios del sistema de las endotelinas, en este trabajo se evaluó la síntesis de los péptidos natriuréticos en el colon murino, los que en otros tejidos han mostrado funciones antagónicas en relación con las endotelinas.

Los primeros estudios relacionados con la presencia de péptidos natriuréticos en el tubo digestivo de mamíferos, datan de finales de la década de los 80'. Vollmar y colaboradores combinando estudios de radioinmunoensayo e inmunohistoquímicos de colon y recto de cobayo, determinaron que los extractos ácidos de yeyuno y colon contienen moléculas semejantes al ANP. A nivel tisular dichos péptidos se localizaron debajo de la lámina muscular de la mucosa [182]. En el mismo trabajo, los estudios cromatográficos mostraron correspondencia con la molécula precursora de ANP de 15 kD (pro-ANP) y que éste puede ser convertido en su forma activa por tratamiento con sobrenadantes de homogenatos colónicos. Estos datos les permitieron proponer que el intestino sería un sitio de síntesis de este péptido. Contemporáneamente, Vuolteenaho y colaboradores demostraron que en rata, extractos ácidos de estómago e intestino delgado contienen péptido natriurético atrial inmunorreactivo [183]. Los estudios por filtración en gel y cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa, mostraron que la inmunoreactividad del estómago consistía en múltiples componentes, mientras que el intestino delgado contenía principalmente material semejante a pro-ANP y ANP 1-28 y se postuló que estos péptidos participarían en la regulación de la absorción de agua y electrolitos. Posteriormente, se realizaron estudios de expresión génica de ANP en el tracto gastrointestinal de rata adulta mediante el análisis de protección de la ribonucleasa, mostrando que estos péptidos son detectables en el estómago, el intestino delgado y el grueso así como en el recto y el ano. En dichos estudios, las mayores concentraciones de los transcritos se detectaron en el estómago proximal, el antro y el colon proximal con niveles que oscilan entre 1 y 10 % en relación con los encontrados en el ventrículo cardíaco [187]. En el mencionado trabajo se sugiere que esta distribución de la síntesis de ANP está relacionada con mecanismos de regulación diferencial específica de tejido, dentro del tracto gastrointestinal. En el presente estudio se demostró tanto la expresión génica como la localización celular y tisular del ANP en colon murino normal. En la región distal, los niveles de expresión génica exhibieron valores superiores a los detectados en el colon proximal, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por otra parte, se ha reportado también la presencia de CNP en colon de conejo y se ha postulado que podría ser un regulador local de la motilidad colónica [188]. Sin embargo, en dicho estudio, para la detección de CNP se utilizó cromatografía líquida

de alto rendimiento de extractos colónicos, por lo que este reporte carece de referencias de la localización tisular o celular. En el presente trabajo, se encontró que el péptido natriurético tipo C, se expresa en colon murino normal, con una distribución similar al ANP.

En el colon proximal ambos péptidos se expresan principalmente en el citoplasma de las células de la mucosa. Adicionalmente, el CNP exhibe una marcación apical bien definida en las criptas de Lieberkhün. En colon distal, en cambio, tanto ANP como CNP exhibieron una localización claramente nuclear. En este sentido éste sería el primer reporte en el que se logró determinar la distribución de ambos péptidos en el colon. Como otras membranas, la membrana nuclear posee receptores acoplados a la proteína G, como los de las endotelinas [228], angiotensina II [229]–[231], bradikinina [232], [233], factor activador plaquetario [234], prostaglandina-E2 [235], [236] y neuropeptido Y (NPY) [237]–[239]. Aún cuando en el presente estudio no se analizó la distribución de los receptores de los PN, la localización de los ligandos permite postular la presencia de éstos en las cubiertas nucleares de los enterocitos, fundamentalmente en el colon distal.

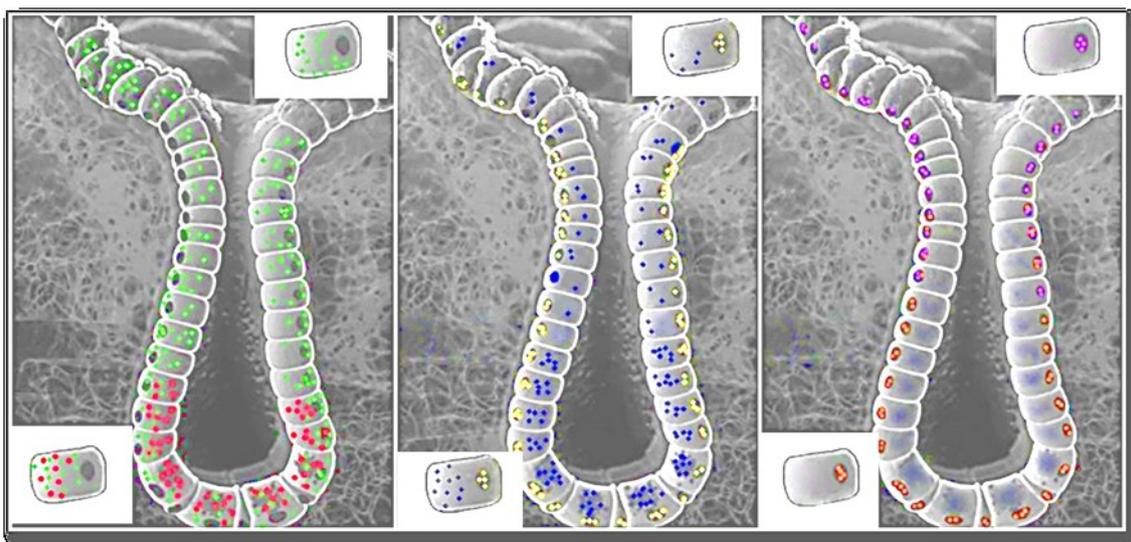


Figura 54. Representación esquemática resumiendo la localización celular del sistema endotelinas y péptidos natriuréticos en las criptas del colon distal. En la figura de la izquierda se representan la distribución de ET-2 (en rojo) y ET-1 (en verde); en la central se representan los receptores ET_A (en azul en el citoplasma) y ET_B (en amarillo a nivel nuclear), mientras que en la de la derecha se muestra la representación esquemática de los péptidos natriuréticos ANP (marrón) y CNP (violeta, a nivel nuclear). Los insertos muestran esquemas magnificados de las células epiteliales de la base y el ápice de las criptas con las variaciones halladas en la expresión de los ligandos peptídicos y los receptores de endotelinas.

6.1.3 Endotelinas y péptidos natriuréticos en el colon normal

El colon, y fundamentalmente su superficie mucosa, constituye un sitio importante de absorción y transporte de agua y sales. En este sentido, guarda estrechas similitudes con el riñón, en el que también se encuentran expresadas las ET [240] y los PN [241]. Dicha coincidencia sugiere que en este sistema de péptidos y sus receptores podrían jugar un papel clave en dicha función.

6.1.3.1 Rol de las ET y los PN en las propiedades mecánicas de las criptas de Lieberkühn

El polo basal de los enterocitos contacta con una matriz extracelular bien desarrollada, la que es sintetizada tanto por las células epiteliales como por las células mesenquimatosas subyacentes. Este “exoesqueleto” virtual interactúa con los receptores de la superficie celular, tales como las integrinas, que transducen la información originada en el entorno celular hacia los compartimentos intracelulares. Desde hace varios años se sabe que estas interacciones juegan un papel clave en la maduración, migración y renovación del epitelio intestinal [242]. Los miofibroblastos subepiteliales intestinales se encuentran en la lámina propia, formando un sincitio que se extiende a lo largo de la misma [243]. En la región basal de las criptas, los miofibroblastos son ovales y escafoides en apariencia y parecen superponerse [244], [245]. Los miofibroblastos se encuentran conectados entre sí mediante uniones estrechas y adherentes. En el extremo apical de las criptas colónicas los miofibroblastos subepiteliales adoptan una morfología estrellada [243], [246], [247]. Los miofibroblastos están embebidos en una lámina subepitelial de fibras reticulares que también contienen fenestraciones a través de las cuales atraviesan linfocitos y macrófagos [248]. Inmediatamente por debajo del epitelio superficial del colon, se encuentra una lámina reticular de fibras colágenas. Los procesos de los miofibroblastos se extienden a través de esta lámina y se apoyan en la lámina basal debajo de las células epiteliales superficiales con procesos que recuerdan a los del glomérulo renal [244], [249]. Por lo tanto, el espacio subepitelial parece tener dos barreras fenestradas: la lámina basal y la lámina de colágeno, ambas formadas por fibrillas de tejido conectivo secretadas por los miofibroblastos. Esta característica anatómica tiene implicancias funcionales para el transporte de agua por el epitelio [250]. Estudios *in vitro* han demostrado que los fibroblastos en cultivo sometidos a diferentes dosis de ET cambian su morfología. A medida que se incrementan los niveles de AMPc, los mismos mutan desde un fenotipo plano, a uno con forma de estrella, revirtiendo este proceso luego del agregado de ET-1 o ET-3, con la consecuente disminución de AMPc [251]. Los estudios usando antagonistas específicos de ET_A y ET_B (BQ123 y BQ788, respectivamente) sugieren que estos cambios están mediados por ambos receptores. En el citado trabajo se verificó que las células endoteliales, adyacentes a la red de fibroblastos, presentan inmunoreactividad para ET-1 permitiendo postular que la regulación de la forma de los fibroblastos estaría mediada por estos péptidos. Sin embargo, dada la homogeneidad que exhibe la marcación de ET-1 a lo largo del eje de la cripta, y teniendo en cuenta la localización sectorizada de ET-2 en el tercio inferior de las criptas en colon distal, se propone que los cambios diferenciales en la morfología de los fibroblastos podrían atribuirse al gradiente diferencial de esta última molécula.

Una hipótesis similar fue postulada para las vellosidades de intestino delgado en el cual, en la base de las vellosidades, los fibroblastos presentan una apariencia plana, adoptando forma de

estrella hacia el extremo de las mismas [71]. En esta región del tracto digestivo, la expresión de ET-2 muestra un gradiente en el eje de las vellosidades, exhibiendo mayor intensidad en la base de las mismas. Teniendo en cuenta además que en el duodeno, la inmunoseñalización de las proteínas vinculadas al citoesqueleto contráctil de las vellosidades intestinales es más intensa en los fibroblastos ubicados cerca de las criptas, que en aquellos situados en el borde apical de las vellosidades, se ha hipotetizado que los fibroblastos planos son favorecidos en su contractibilidad citoplasmica y en el mantenimiento de la tensión, mientras que los fibroblastos con forma de estrella carecerían de esta función en dichos procesos [252]. En base a estas observaciones, se asoció al sistema de las endotelinas y particularmente, al péptido ET-2, con un importante rol en el mantenimiento del estrés mecánico y/o de la contracción en los fibroblastos localizados en la base de las vellosidades, de forma cooperativa con ET-1. Dada la expresión de ET-1 y ET-2 detectada en las criptas del colon, principalmente en la región distal en la cual se agudiza el estrés mecánico, ambas isoformas podrían estar ligadas a una función semejante a la postulada en las vellosidades intestinales.

Además de presentar receptores para las ET, los miofibroblastos intestinales poseen receptores que promueven la relajación contráctil, tales como los de los péptidos natriuréticos ANP (NPR-A) y CNP (NPR-B) [253]. En el mencionado estudio, utilizando cultivos de células 18Co, una línea celular colónica humana que exhibe la mayoría de las características de los miofibroblastos subepiteliales intestinales, se sugiere que estos péptidos podrían modular la contracción de dichas células antagonizando a las ET. Dada la distribución de ANP y CNP hallada en el presente trabajo, se puede postular que el principal candidato para antagonizar a ET-2 en el colon distal sería el factor natriurético atrial, mientras que el tipo C podría estar vinculado con efectos antagónicos sobre ET-1.

6.1.3.2 Rol de las ET y los PN en la motilidad intestinal

El sincitio fibroblástico se extiende a través de la lámina propia del intestino fusionándose con los pericitos, que circundan los vasos sanguíneos irrigando el tejido [243]. En estas células musculares lisas que rodean los vasos se han detectado receptores de las ET, las que probablemente son las responsables de los fenómenos de vasoconstricción [254]. Reforzando este postulado, los trabajos usando conejillos de indias, Okabe y colaboradores, demostraron que las ET ejercen un efecto directo en la contracción de las células musculares lisas que circundan el ciego [255]. Por el contrario, la síntesis y liberación de los péptidos natriuréticos (ANP y CNP) en la capa muscular podría estar relacionada con su función antagónica, promoviendo la relajación del intestino. En este sentido, estudios recientes mostraron que CNP actúa específicamente sobre el píloro, el colon y el recto contribuyendo al vaciado gástrico [189]. La presencia de CNP en colon podría estar ligada a la regulación del tránsito intestinal,

sin embargo, los posibles roles de los péptidos natriuréticos en la fisiología del colon aún no han sido completamente dilucidados y requieren la realización de estudios funcionales para su clarificación.

6.1.3.3 Rol de las ET y los PN en la absorción de agua y sales

Como se mencionó previamente, la principal función del colon es la absorción de agua y sales. Las criptas colónicas actúan como dispositivos de succión para deshidratar las heces en el segmento distal del colon de los mamíferos [256], [257]. Como es sabido, tal proceso requiere la absorción en el colon de un fluido hipertónico [258], aunque al presente, el mecanismo no ha sido totalmente dilucidado [259]. La vaina de miofibroblastos representa una barrera de difusión al transporte de Na^+ que crea un compartimiento central significativamente hipertónico entre las uniones estrechas epiteliales y el sistema vascular. Se ha demostrado experimentalmente que este modelo de tres compartimentos permite el transporte hipertónico de acuerdo con el modelo de Curran-MacIntosh de movimiento del agua a través de los tejidos epiteliales [245], [260], [261]. Las células epiteliales que recubren el interior del colon de euterios forman un epitelio de baja resistencia ($\sim 100\Omega\cdot\text{cm}^2$) en el segmento proximal. La resistencia es aproximadamente dos a cuatro veces mayor en el colon distal de rata, que por lo tanto, puede describirse como un epitelio de resistencia “moderada” o “intermedia” [262]–[264], mientras que en el colon distal murino los valores son aproximadamente dos veces más elevados. Aquí la resistencia paracelular es alta, comparada con la transcelular [265]. Las células epiteliales colónicas exhiben alta conductividad, con una mayor densidad de canales iónicos en la membrana luminal de la superficie, en comparación con las células de la cripta. El resultado del transporte de iones es la excreción de heces que contienen entre 5-125 mM de Na^+ , 5-30 mM de Cl^- y 30-200 mM de K^+ [266]. Se ha demostrado que ET-1 puede actuar en la regulación del equilibrio natriurético [75], [267]. Es sabido que ET-1, vía la interacción con el receptor ET_B , media la activación de los intercambiadores NHE-3 en el túbulo proximal renal [268]. La inhibición de ENaC por ET-1 también se ha establecido en células renales [269]. Debido a que en el colon distal predomina el sistema de absorción electrogénica por sobre la electroneutra, la mayor expresión de ET-1 en este segmento tendría un efecto general de inhibición de los intercambiadores iónicos, contribuyendo al aumento de la resistencia epitelial.

6.1.3.4 Rol de las ET y los PN en el sistema inmune intestinal

En el colon el sistema de las ET también podría estar involucrado en la respuesta inmune. En la presente tesis se ha encontrado marcación de las ET en células inmunes, las cuales podrían sintetizarlas y/o responder a las mismas. Los estudios pioneros de Ehrenreich y colaboradores demostraron que los macrófagos humanos sintetizan endotelinas, lo que llevó a hipotetizar que estas células desempeñan un papel en el microambiente tisular en el que se encuentran alojados

[270]. Adicionalmente, el rol quimiotáctico de ET-1 es aún motivo de controversia, en esta línea Bath y colaboradores reportaron que éste no posee ningún efecto como factor de reclutamiento [271], mientras que Achmad y Rao sostienen que el péptido ET-1 es un quimioattractante débil para monocitos [272]. Posteriormente, se encontró que un nuevo péptido similar ET-1 de 31 aminoácidos, es sintetizado por los neutrófilos y posee una potente actividad quimiotáctica para neutrófilos humanos y monocitos [273], que no se verificó para la ET-1 de 21 residuos de aminoácidos. En la arteria pulmonar, Peacock y colaboradores demostraron que ET-1 y ET-3 son quimioattractantes para fibroblastos [274] mientras que por su parte, ET-2 ha probado ser un quimioattractante para neutrófilos [275]. Adicionalmente, ET-2 es un quimioattractante y activador de macrófagos [157]. La presencia de las ET en la lámina propia de la mucosa y en la submucosa, verificada por las inmunomarcaciones específicas, podría relacionarse a estas funciones quimiotácticas. Además, tanto ET-1 como los receptores ET_A y ET_B están íntimamente involucrados en el sistema inmune adaptativo, lo que se discutirá en la sección 6.2.5.2, dado que en los estados patológicos se puede comprender mejor el rol que se ha postulado cumplen estos péptidos.

Los péptidos natriuréticos también están implicados en la respuesta inmune innata del colon. El estudio de Krause y colaboradores demostró que ANP, BNP y en menor grado CNP, presentan actividad antimicrobiana dependientes de la dosis para bacterias Gram (+), Gram (-) y levaduras [276]. La mayoría de los péptidos antimicrobianos (PAM) conocidos, son catiónicos, lo que significa que, a pH fisiológico, poseen carga neta positiva debido a la presencia de una alta proporción de los residuos de los aminoácidos arginina y lisina. Los PN exhiben esta característica, lo que se ve reflejado por su alto punto isoeléctrico. Además de esta propiedad catiónica común, los PAM a menudo adoptan una estructura anfipática con un polo hidrofóbico y uno hidrofílico. El carácter catiónico de los PAM, asociado con su tendencia a adoptar una estructura anfipática facilitaría su interacción e inserción en las paredes celulares aniónicas y en las membranas fosfolípídicas de los microorganismos [277]. Se han propuesto varios mecanismos para explicar su modo de acción, tales como (i) la captación auto-promovida, (ii) el modelo tipo alfombra y (iii) la formación de poros [278]. Este último mecanismo ha sido demostrado para CNP-39 sintético humano [279]. En la presente tesis, no sólo se logró detectar la expresión génica de ANP y CNP en el colon, sino que se obtuvo su localización, la cual resultó principalmente citoplasmática en colon proximal, mientras que en el colon distal es casi exclusivamente nuclear. La presencia de estos péptidos, principalmente en el epitelio del colon proximal, debido a su localización citosólica y en vesículas secretoras mucosas, sería un indicio de la síntesis *in situ* para su posterior liberación en la superficie mucosa y ulterior interacción con microorganismos del tracto colónico. Debe destacarse que también se detectó la presencia

de las ET en estas vesículas mucosas, aunque las mismas carecen de estructura química catiónica y al presente, no se ha postulado que cumplan funciones antimicrobianas activas.

Al igual que las endotelinas, los péptidos natriuréticos son moléculas pleiotrópicas, que pueden actuar a distintos niveles en la homeostasis del colon. Resulta importante destacar el hecho que ET-1 constituye un factor estimulador de la liberación de ANP en una variedad de células y tejidos [280]–[286] y asimismo se ha probado que el ANP también actúa como modulador de la síntesis de ET-1 [287]; [288]. Dadas las interacciones cruzadas que exhiben estos péptidos en los sistemas cardiovascular y renal, así como en la función endocrina [284], se postula que el sistema de las endotelinas y los péptidos natriuréticos también podrían hacerlo a nivel del tracto intestinal.

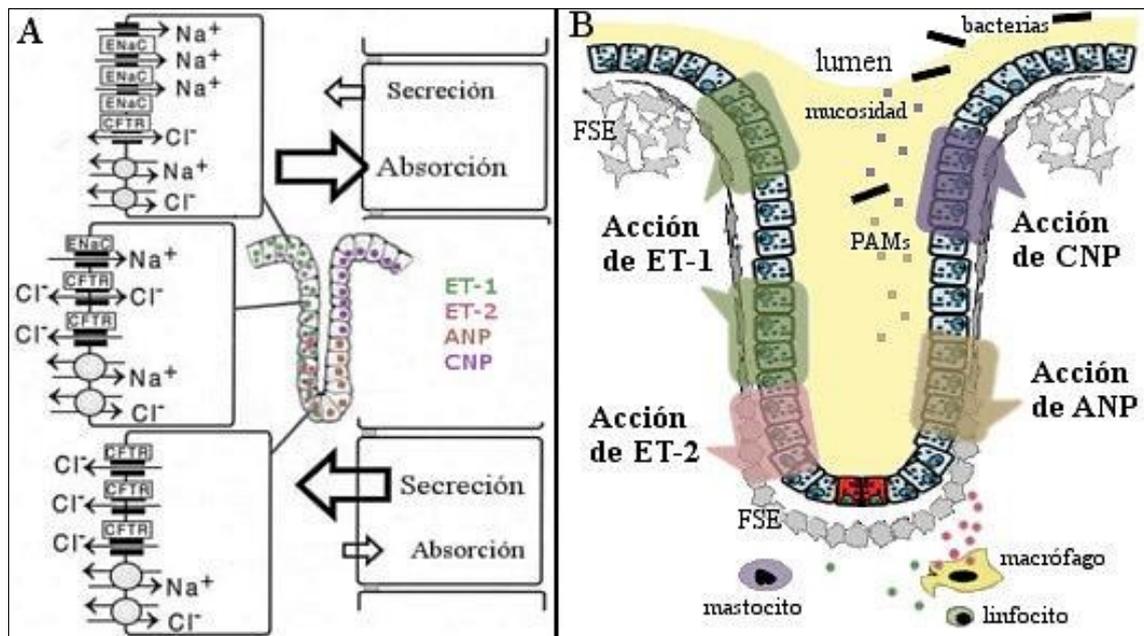


Figura 55. Representación esquemática que resume las posibles funciones de las ET y PN en una cripta de Lieberkühn de colon distal normal. A) La localización de ET-1, ET-2, ANP y CNP. La ET-1 (verde) se distribuye homogéneamente en el citoplasma y en ocasiones en los núcleos de las células epiteliales. En el caso de ET-2 (rojo) ésta se localiza sólo en las células basales de las criptas. El ANP (marrón) y el CNP (violeta) exhiben una localización nuclear. ANP se encuentra localizado principalmente en las células basales de la cripta, mientras que la del segundo, se ubica en la parte superior. La absorción de agua y sales se da fundamentalmente en el extremo apical de la cripta, principalmente mediante el intercambiador ENaC, mientras que la secreción de Cl^- ocurre fundamentalmente en la parte inferior. En colon distal, ET-1 actuaría inhibiendo la acción de ENaC, incrementando la resistencia de las células epiteliales. B) Como puede observarse, los fibroblastos subepiteliales cambian su fenotipo a lo largo del eje de la cripta, desde una morfología ovoide, superpuestos unos con otros en la base de las criptas, hasta una morfología estrellada en parte superior. ET-1 y ET-2 modularían la interconversión de la forma celular del fibroblasto, regulando de esta forma las fenestraciones del sincitio que se extiende en la lámina propia. La acción de ET-2 reforzaría la de ET-1. ANP y CNP, regularían la expresión génica de las ET, actuando mediante receptores nucleares. Ambos péptidos natriuréticos mediarían la interacción del epitelio con la flora intestinal. ENaC: Canal de sodio epitelial, CFTR: regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, FSE: fibroblastos subepiteliales, PAM: péptidos antimicrobianos.

6.2 Desarrollo de cáncer colorrectal inducido

En roedores, el cáncer de colon inducido por carcinógenos permite recapitular las fases de iniciación y progresión tumoral de humanos con un alto grado de reproducibilidad y confiabilidad. Estos modelos se emplean frecuentemente para evaluar la actividad de los compuestos quimiopreventivos e identificar posibles factores de riesgo [198].

Incluso cuando las dosis del carcinógeno suministradas experimentalmente son altas y difieren de las que se dan normalmente en humanos (en los que los tumores surgen de la exposición a pequeñas dosis de los carcinógenos presentes en la dieta occidental y a diversos factores ambientales), hay una serie de ventajas al estudiar la patogénesis del cáncer de colon inducido en roedores. Estos modelos son altamente reproducibles, pueden ser fácilmente probados en animales con diferentes antecedentes genéticos y la patogénesis permite recapitular el CCR humano [198].

Los carcinógenos químicos más ampliamente utilizados para inducir lesiones de colon similares a la malignidad humana son: (a) las aminas heterocíclicas, (b) las aminas aromáticas, (c) los compuestos de alquilnitrosamida, (d) la dimetilhidrazina y el azoximetano. Para estos compuestos se han descrito las propiedades carcinógenas y sus efectos sobre la histogénesis, la cinética de proliferación celular, así como la interacción entre los caracteres genéticos de susceptibilidad y los factores ambientales.

Clásicamente, la 1,2-dimetilhidrazina (DMH) o su metabolito, el azoximetano (AOM), se han utilizado para inducir CCR en ratones y ratas. DMH es un precursor del metilazoximetanol (MAM), un carcinógeno encontrado en la harina de Cycadaceas [289]. Tanto el DMH como el AOM requieren varios pasos de activación metabólica (incluyendo N-oxidación e hidroxilación) para formar aductos que reaccionen con el ADN. La hidroxilación del AOM da lugar a la formación del metabolito reactivo MAM, que puede ejercer un efecto alquilante sobre macromoléculas hepáticas y del colon, así como promover la adición de grupos metilo en las posiciones O⁶ o N⁷ de la guanina (O⁶-metil-desoxiguanosina y N⁷-metil-desoxiguanosina) de las moléculas de ADN. La metilación en la posición O⁶ de la guanina ha demostrado ser la principal lesión promutagénica producida por el AOM [290]. Otras enzimas están implicadas en la activación metabólica del AOM. Un estudio *in vitro* sugiere que la activación de MAM en ratón, es independiente de la alcohol deshidrogenasa del colon (ADH4) [291]. Por otra parte, la isoforma CYP2E1 del citocromo P-450 inducible por el alcohol, juega un papel importante en la conversión del AOM en MAM [292].

En los estudios pioneros, se demostró que la administración repetida de DMH en roedores induce tumores de colon, con características patológicas similares a las observadas en la

enfermedad humana esporádica [111], [293]. Los estudios posteriores comenzaron a utilizar AOM [1], [112], [113] debido a las ventajas prácticas tales como la reproducibilidad, su alta eficacia, la simplicidad de su aplicación, la excelente estabilidad en solución y el relativamente bajo costo [112].

Los tumores inducidos por DMH o AOM comparten muchas de las características histopatológicas del CCR humano y con frecuencia, exhiben mutaciones en los genes de K-Ras y β -catenina. En algunos se logran reproducir fenómenos de inestabilidad de microsatélites, indicativos de defectos en sus sistemas de reparación de fallas. Sin embargo, en roedores las mutaciones de los genes *APC* y *p53* son poco frecuentes y su capacidad para inducir metástasis es pobre [294].

En la presente tesis, para inducir el desarrollo del CCR se empleó AOM, complementado con el suministro de SSD disuelto en el agua de bebida [1]. Dicho protocolo posibilita una rápida obtención de múltiples tumores colónicos en ratones de la cepa endogámica BALB/cCmedc. El SSD resulta tóxico para el revestimiento epitelial del colon, provocando colitis severa, caracterizada por pérdida de peso corporal, diarrea y sangrado. En los experimentos conducidos en la presente tesis, se corroboró esta sintomatología a la semana del inicio del consumo de SSD, la cual fue cesando alrededor de la cuarta semana.

6.2.1 Fisiopatología del CCR en el modelo AOM/SSD

El cáncer colorrectal (CCR) es, en cuanto a frecuencia, el cuarto tipo más común en el mundo [295]. En la actualidad es ampliamente aceptado que la colitis predispone al desarrollo tumorogénico colorrectal [296]–[298]. Así se ha determinado que los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD del inglés *Inflammatory bowel disease*), tienen un elevado riesgo de desarrollar cáncer de colon, aunque la magnitud de este riesgo ha sido recientemente objeto de debate [299], [300]. Mientras que la patogénesis molecular del cáncer asociado a la colitis (CAC) permanece incompletamente comprendida, se han realizado avances significativos a partir del estudio de los modelos murinos de esta patología. Uno de los modelos de CAC más utilizados consiste en la aplicación de AOM/SSD. Este es un modelo de iniciación-promoción que genera daños del ADN por la inducción química, seguido de ciclos repetidos de colitis. El método es considerado muy robusto, reproducible y relativamente económico [1], [113], [198], [301].

Como se indicó previamente, el AOM, vía su metabolito activo (MAM), actúa principalmente induciendo la formación de aductos de O⁶ metilguanina en el ADN, lo que resulta en transiciones G→A [291]. Después de la excreción en la bilis, es absorbido por el epitelio del colon e induce la mutagénesis. El SSD es un polisacárido similar a la heparina que se disuelve

en el agua potable, e inflige daño del epitelio colónico, induciendo colitis que mimetiza algunas de las características de la IBD [302].

La progresión del CCR se realizó mediante el seguimiento anátomo-histológico de la patología. Las primeras lesiones encontradas fueron los focos de criptas aberrantes (FCA), los cuales se evidenciaron en el colon distal, promediando la cuarta semana de la inducción. La identificación de los FCA permitió el estudio de las etapas precancerosas del CCR. A finales de la década del 80', Bird describió a los FCA como lesiones colónicas preneoplásicas de los roedores tratados con carcinógenos [81]. En los seres humanos, los FCA se describieron y se caracterizaron parcialmente con posterioridad [303] y poco tiempo después se describieron los procesos proliferativos de criptas alteradas [86].

Los FCA pueden observarse en pacientes con CCR esporádico y poliposis adenomatosa familiar [304]. Estas lesiones humanas, guardan estrechas similitudes con las criptas aberrantes desarrolladas en los roedores tratados con carcinógenos.

En los FCA observados en las tinciones de H&E y confirmadas por la tinción PAS/AA, se verificó una disminución del número de células goblet y en las remanentes, el contenido de mucopolisacaridos es escaso. Dicho comportamiento puede atribuirse a la profusa liberación de secreciones mucosas, como respuesta del sistema inmunológico para impedir la invasión microbiana, emulada por la colitis inducida por el SSD. Esto se reflejaría en el fenotipo de células goblet vaciadas, observadas a la cuarta semana posterior a la inducción del CCR. Se ha sugerido que la carencia de esta capa protectora podría potenciar aún más la inflamación local, favoreciendo el desarrollo del cáncer [305]–[307]. Adicionalmente, la carencia de la cubierta mucosa favorece la invasión bacteriana directa del epitelio y activa la respuesta del sistema inmunológico submucoso [308]. Confirmado estos datos, se ha observado que ratones con el gen MUC2 noqueado, incapaces de generar normalmente la cubierta mucosa, son proclives a desarrollar inflamación diarreica, hemorragia, prolapso rectal e hiperproliferación de células epiteliales, lo que a menudo conduce al desarrollo de tumores a edad avanzada [309]–[311].

En el presente trabajo, todos los animales inducidos presentaron lesiones, en algunos casos con displasias leves y cambios reactivos de las criptas y en otros se observaron displasias severas. También se verificaron procesos ulcerativos de la mucosa, con displasias focales, infiltración de la lámina propia por células inflamatorias, erosión y en algunos casos formación de abscesos, tal como se describió en la sección resultados. El estado inflamatorio disminuyó progresivamente en las semanas siguientes a la administración de SSD y finalmente terminó remitiendo completamente.

En la octava semana posterior a la inyección de AOM, se observó el desarrollo de adenocarcinomas *in situ* bien diferenciados, en su mayoría planos, con características tubulares

o tubulovelloso que pueden clasificarse como tipo T0, ya que no invaden la submucosa. Por el contrario, en la decimosexta semana se observaron adenocarcinomas intramucosos bien diferenciados que en su mayoría se clasificaron como T0, aunque se verificó un caso en el que se observa invasión a la submucosa en un adenocarcinoma pediculado (T1). Según lo esperado, tal como fue descrito previamente [1], la invasividad del modelo es baja, pudiendo confirmarse escasos adenocarcinomas invasivos principalmente a la vigésima semana posterior a la inducción. En este caso, se observó un único tumor con estas características (T1) en la decimosexta semana. En la vigésima semana, se verificaron incrementos en el tamaño de los tumores con intensificación de la dediferenciación celular, aunque no pudo confirmarse su carácter invasivo.

Mediante la utilización de microscopía bifotónica, se logró la caracterización y cuantificación del grado de alteración de los tejidos previamente teñidos con H&E. Mediante esta herramienta, se obtuvieron imágenes de SHG y se cuantificaron los cambios en la organización de las fibras colágenas. Los estudios de Birk y colaboradores demostraron que, mediante el análisis del arreglo de las fibras colágenas y calculando el parámetro de alineamiento β , es posible distinguir con alta sensibilidad y especificidad, displasias de alto grado y procesos cancerosos que afectan la mucosa colónica [312]. Sin embargo, el método no permite distinguir entre tejidos normales y displasias de bajo grado. En la presente tesis, aplicando sobre las imágenes la función Transformada Rápida de Fourier (FFT), seguida de su procesamiento, permitieron distinguir cambios en el ordenamiento del colágeno tan tempranamente como a la cuarta semana posterior a la inducción del CCR en ratones BALB/cCmedc. En la decimosexta semana posterior a la inducción del CCR se obtuvieron los mayores valores de relación de aspecto, indicando en este estadio, el incremento de la desorganización y la mayor proporción de fibras desalineadas.

Es aceptado que el CCR se desarrolla como un proceso de múltiples etapas en el que las criptas normales se alteran formando los FCA. Éstos proliferan, y sus criptas se fusionan dando lugar a las estructuras denominadas microadenomas. Los mismos, incrementan su tamaño originando adenomas macroscópicos, pólipos adenomatosos y finalmente, los adenocarcinomas [198]. Como puede comprobarse, existe una progresión morfológica y genética a través de una secuencia adenoma-carcinoma [313]. En este trabajo se logró reproducir tal progresión, y una vez logrado este objetivo se avanzó con el análisis del sistema de las endotelinas y los péptidos natriuréticos en los distintos estadios de ésta progresión maligna.

6.2.2 En CCR, ET-2 es indetectable en el colon distal

Como se indicó previamente, en condiciones normales la ET-2 exhibe una menor expresión génica en colon distal, en relación a la observada en el segmento proximal, aunque mediante RT-*sq*PCR puede detectarse en ambos segmentos.

Tan tempranamente como a la cuarta semana postinducción del CCR, se verifica un notable cambio en relación con la expresión de ET-2 en colon distal ya que se tornó indetectable en dicho segmento. Esta abrupta modificación del perfil de expresión se produce en concordancia con las primeras alteraciones morfológicas preneoplásicas de la mucosa. Por el contrario, en el caso del colon proximal, que se mantiene inalterado en relación con los tejidos normales, no se verificaron cambios en la expresión génica de ambos péptidos. En las semanas ulteriores de la progresión del CCR (semanas octava, decimosexta y vigésima), los transcritos de ET-2 en el colon distal continuaron siendo indetectables, lo que se correlaciona con el desarrollo de múltiples tumores. Adicionalmente, se observó que conforme se produce el agravamiento de la patología, los tumores tienden a expandirse hacia el colon proximal. Un hallazgo fundamental en la presente tesis es que, junto con la expansión de los tumores hacia el colon proximal, en la vigésima semana, los transcritos de ET-2 en este segmento también se tornan indetectables. Dicho comportamiento fue confirmado mediante los estudios de inmunofluorescencia, ya que en las muestras de este estadio no se verificó marcación específica para este péptido.

Estos resultados son coincidentes con varios reportes que han determinado que, a diferencia de lo que ocurre con ET-1, los niveles de expresión génica de ET-2 son bajos o indetectables en los cánceres de colon tanto humanos como de rata [314]; [117]. En un trabajo reciente, Wang y colaboradores analizaron cánceres de colon neoplásicos humanos y tumores de colon de rata inducidos por agentes carcinógenos, encontrando que, los tumores de colon de rata y humanos reducen notablemente la expresión de ARNm y peptídica de ET-2 y ET-3, en comparación con los controles correspondientes. Los estudios revelaron que se produce hipermetilación de los genes EDN2 y EDN3 en cánceres neoplásicos de colon humanos, así como también en un panel de líneas celulares de cáncer de colon humano. En el mismo trabajo se demostró que la expresión forzada de ET-2 y ET-3 atenúa significativamente la migración e invasividad de las células colónicas cancerosas humanas. Así, se concluye que la inactivación epigenética de ET-2 y ET-3 es un fenómeno frecuente en el cáncer de colon humano y de rata. Los autores sugieren estrategias terapéuticas basados en la reexpresión de ET-2 y ET-3 como antagonistas naturales de ET-1 en cáncer de colon [158]. Adicionalmente, es importante destacar que, en el modelo de rata estudiado por Wang, la falta de expresión de ET-2 en la mucosa colónica precede en varias semanas la aparición de los tumores, lo que les permite sugerir que la reducción de su expresión podría constituir un biomarcador temprano del desarrollo del CCR.

Teniendo en cuenta las posibles funciones asociadas a ET-2 en el colon distal normal, el silenciamiento de dicho péptido afectaría principalmente la función de los fibroblastos subepiteliales, los que revertirían el fenotipo oval plano hacia uno con forma de estrella, característica que resulta coherente con las de los fibroblastos asociados al cáncer (FAC). Éstos

son morfológicamente similares a los miofibroblastos, los cuales se caracterizan por incrementar su tamaño, tornarse ahusados y activarse durante los procesos de cicatrización [315].

6.2.3 ET-1 y receptores en el desarrollo del CCR

Como se mencionó previamente, los receptores de endotelinas exhiben modificaciones en los niveles de expresión en el curso del CCR [115], [124], [316]. En el presente trabajo se determinó que los niveles de expresión génica del receptor ET_A, se hallan marcadamente incrementados a la cuarta semana de inducción. Dicho incremento se da fundamentalmente en el segmento proximal del colon, aunque morfológicamente, el segmento no exhibe alteraciones significativas. En la octava semana posterior a la inyección de AOM, los niveles de expresión génica de ET_A no sólo se vieron fuertemente incrementados en los animales inducidos a desarrollar CCR en el segmento proximal, sino que también se verificó un aumento significativo en el segmento distal. En las semanas decimosexta y vigésima, el incremento en la expresión del receptor sólo mostró diferencias estadísticamente significativas en colon proximal. En este último estadio, si bien se observaron diferencias entre los niveles de expresión génica de ET_A entre el colon distal de los animales normales y los que exhiben tumores, la variabilidad verificada en el tejido tumoral fue muy marcada. En la bibliografía analizada no existen trabajos que empleen modelos animales y muestren cambios en la expresión génica del receptor ET_A durante el desarrollo de CCR. No obstante, en coincidencia con los resultados aquí reportados, Ali y colaboradores, mediante técnicas de autoradiografía demostraron sobreexpresión de los receptores ET_A en cultivos celulares que reproducen algunas de las características del CCR [316]. Resultados similares fueron reportados por Hoosein y colaboradores, quienes hallaron que la unión a los receptores ET_A fue mayor en vasos sanguíneos y fibroblastos asociados con el CCR y en menor grado, en las células epiteliales cancerosas, en comparación con la verificada en cultivos celulares normales [317]. En dicho estudio, se postula que los cambios en la unión al receptor de ET_A observado en células epiteliales cancerosas, fibroblastos y células endoteliales asociadas con cáncer, podría favorecer la señalización de ET-1 y promovería el crecimiento del cáncer colorrectal y la neovascularización mediada por ET_A. Los autores sostienen que esto podría proporcionar la base para el uso terapéutico de antagonistas específicos de ET_A como tratamiento adyuvante del CCR. Resultados semejantes fueron obtenidos más recientemente por Liakou y colaboradores [124].

Por el contrario, en estos estudios se comprobó que el receptor ET_B muestra altos niveles de expresión en el colon normal, mientras que sus niveles disminuyen drásticamente en células cancerosas colónicas. En los trabajos de Hoosein y colaboradores se determinó que la disminución de expresión afecta la neovascularización de los procesos asociados al cáncer, los fibroblastos y en menor medida las células epiteliales [115]. Reiterando lo descripto

previamente, los estudios aquí reportados muestran que en la cuarta semana postinducción, los niveles de expresión génica del receptor ET_B exhiben una marcada disminución en el colon distal, aunque dichos valores se incrementan gradualmente en las etapas posteriores del proceso (semanas octava, decimosexta y vigésima posteriores a la inyección de AOM), tendiendo a reestablecer los valores normales. Por el contrario, los niveles de expresión en el colon proximal de los animales inducidos a desarrollar CCR, no exhiben cambios significativos respecto de los valores verificados en los normales.

En las regiones en las que se verifican lesiones, la expresión del receptor ET_A, es conspicua en las células del sistema inmune y se encuentra especialmente localizada en el citoplasma de los linfocitos infiltrantes, aunque también puede verificarse en el citoplasma de células tumorales. La localización del receptor ET_B, en las regiones displásicas, al igual que en los tejidos normales, es nuclear tanto en las células epiteliales como en las del sistema inmune.

Así, el presente reporte sería el primero en describir la alteración de la expresión génica de los receptores de endotelinas durante el desarrollo del CCR en un modelo murino, contemplando las complejas interacciones que pueden darse en un ser vivo.

En la cuarta semana posterior a la inducción del CCR, la expresión génica de ET-1 en el segmento distal del colon, exhibe niveles menores a los detectados en los animales normales, aunque estas diferencias no resultan estadísticamente significativas. Por el contrario, en la octava semana del experimento, la expresión de ET-1 en colon distal se incrementa respecto de la hallada en los mismos segmentos de animales normales, aunque no exhibe diferencias estadísticamente significativas. En ambos puntos muestrales, la expresión génica de ET-1 resulta significativamente superior en el colon distal respecto a la hallada en el segmento proximal. En la decimosexta semana del experimento, conforme se agrava el proceso tumoral, la expresión génica de ET-1 en colon distal cae abruptamente y muestra diferencias estadísticamente significativas respecto del mismo segmento de animales normales. Esta misma situación se mantiene en la vigésima semana posterior a la inducción del CCR, aunque en este caso no se verificaron diferencias estadísticamente significativas. Asham y colaboradores, utilizando radioinmunoensayo mostraron que los niveles de ET-1 en plasma fueron significativamente superiores en pacientes con tumores primarios de colon y en pacientes con metástasis hepática, comparados con pacientes normales [160]. Por otro lado, en contraposición a lo detectado en el modelo de CCR empleado en esta tesis, Egidy y colaboradores, empleando tejidos quirúrgicos humanos de ciego y de colon sigmoide, concluyen que tanto los transcritos de ET-1, como el péptido y la ECE-1 se encuentran sobreexpresados en el CCR [318]. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las técnicas de evaluación utilizadas en dicho trabajo son de índole cualitativa y basadas en un relativamente escaso número de muestras. Además, se ha

demostrado que el receptor ET_B es importante para la depuración de ET-1 [319] y que el uso de un antagonista de dicho receptor, aumenta los niveles circulantes de ET-1 [320]. En conclusión, si bien no hay un aumento de ET-1 en colon distal a nivel de expresión génica, la baja expresión del receptor ET_B podría provocar un aumento del péptido activo, debido a la reducción de su depuración y un aumento de la actividad del eje ET_A/ET-1.

6.2.4 Péptidos natriuréticos en el desarrollo del CCR

En la cuarta semana posterior a la inyección de AOM, estadio en el cual se observó la inflamación intestinal y la colitis, los transcritos de ANP se incrementan tanto en el colon proximal como en el distal, mientras que los del CNP en colon proximal exhiben variaciones mínimas y en el colon distal sufren una importante disminución (5,4 veces del valor de la media en colon normal). Sin embargo dichas variaciones no muestran diferencias estadísticamente significativas.

La expresión de ambos péptidos en el colon murino confirma que este segmento del tracto digestivo constituye un importante sitio extracardíaco de síntesis. Gower y colaboradores informaron la expresión de ARNm de ANP en el tracto digestivo, mostrando la mayor concentración en el estómago proximal, antro, colon proximal y recto [187]. En relación con el péptido natriurético tipo C, existen reportes tempranos confirmando su presencia y la del péptido natriurético Dendroaspis en el colon [188] [321]. Adicionalmente, en dichos reportes se ha descrito la expresión de los receptores de los péptidos natriuréticos A y B, y adicionalmente del receptor C en colon de rata. Estudios recientes realizados utilizando RT-PCR permitieron la detección de transcritos del receptor de péptidos natriuréticos-A en células de la lámina propia y del receptor de péptidos natriuréticos -C en células epiteliales de las criptas del colon [322]. En este mismo trabajo, se registró un aumento tanto de los niveles del transcritos como de la proteína del receptor de péptidos natriuréticos-A en un modelo de colitis experimental inducida por SSD.

La colitis a menudo se asocia con los cambios en la motilidad intestinal que conducen al estreñimiento o a la diarrea en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal [323]. Se ha informado que la contractilidad del colon está alterada en los modelos animales de colitis [324]. En este sentido, se ha demostrado que el tejido colónico de ratas con colitis inducida por SSD, exhibe reducida contractilidad en respuesta al carbacol y KCl [325]. Sin embargo, en los trabajos de Lee y colaboradores conducidos en ratas tratadas con SSD, se verifica que la frecuencia de motilidad basal se reduce, aunque la contractilidad (o amplitud) resulta similar a observada en las ratas control [322]. En dicho trabajo se prueba que el ANP inhibe la frecuencia de motilidad basal, requiriéndose dosis 30 veces mayores de 8-Br-GMPc para emular la inhibición del ANP. Las respuestas inhibitorias de la motilidad basal de ANP y 8-Br-GMPc se

incrementaron en ratas tratadas con SSD. En el trabajo se postula que en ratas tratadas con SSD, la razón para el aumento del efecto de ANP sobre la motilidad basal del colon puede atribuirse a la regulación positiva de los niveles de expresión génica colónica del receptor de péptidos natriuréticos-A y asimismo de la actividad del receptor de guanilina ciclasa A [322].

El aporte de la presente tesis, profundiza los hallazgos en modelos de colitis inducida por SSD, ya que el seguimiento de la patología se prolongó por veinte semanas. Durante el desarrollo del experimento, los niveles de expresión génica de ANP tanto en colon proximal como en el distal, no sufrieron variaciones significativas respecto de los valores normales. En el caso de CNP, una situación similar se dio en el segmento proximal. Por el contrario, en el colon distal los niveles de CNP disminuyeron en la cuarta semana, aumentando progresivamente hasta alcanzar valores 3,9 veces superiores a los del colon distal normal hacia el final del experimento (vigésima semana posterior a la inducción del CCR), mostrando significatividad estadística. Además, mediante la técnica de inmunofluorescencia se visualizó la presencia del péptido, mostrando nuevamente valores de expresión aumentados (Figura 56).

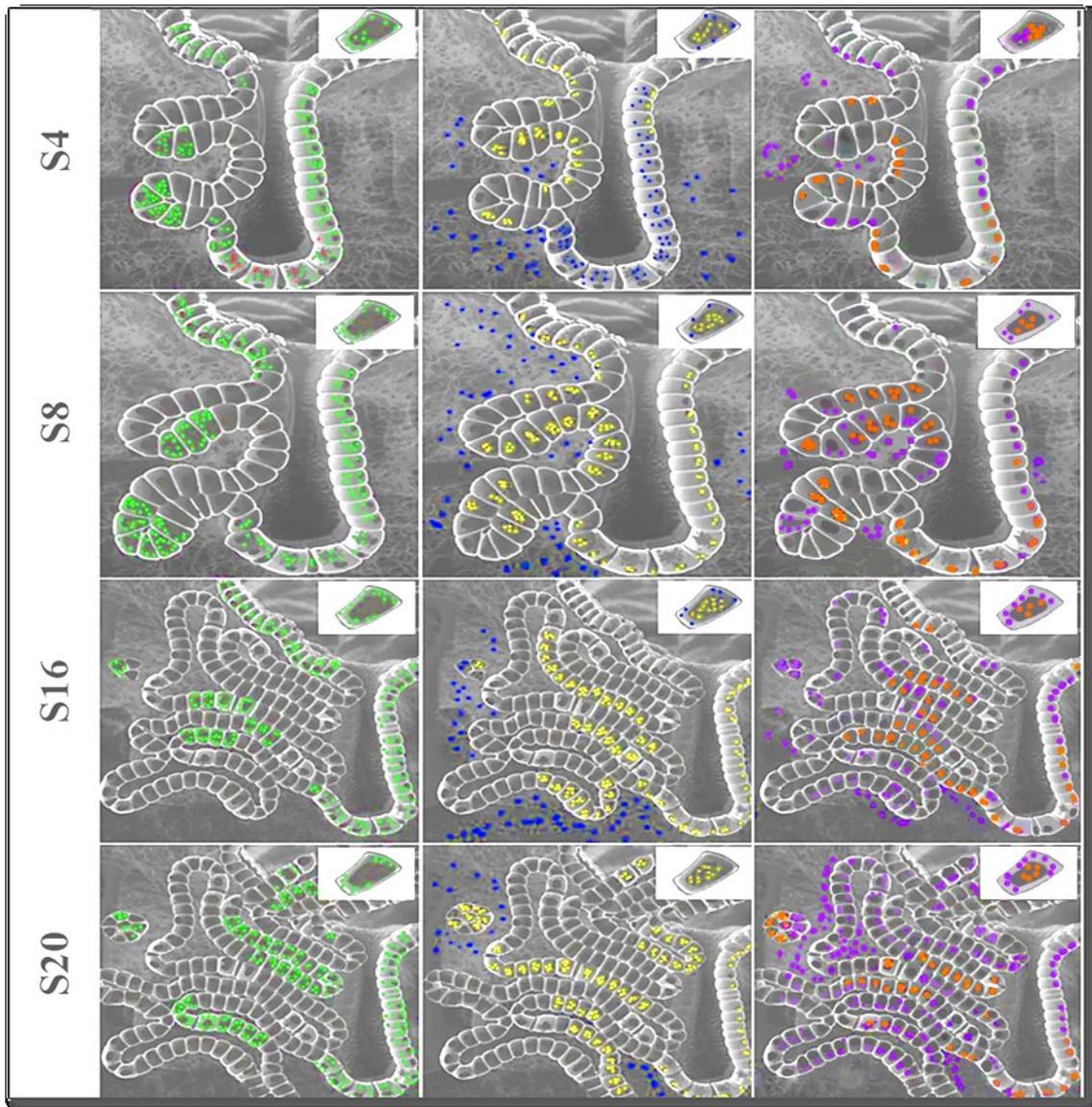


Figura 56. Representación esquemática de la localización celular del sistema endotelinas. Las figuras de la columna izquierda representan al péptido ET-2 (en rojo) y ET-1 (en verde); las figuras de la columna del medio representan a los receptores ET_A (en azul) y ET_B (en amarillo) y las figuras en la columna de la derecha representan al péptido ANP (marrón) y CNP (violeta). Las figuras representan una cripta modificándose en la patología y el inserto una de las células del epitelio.

6.2.5 Roles de las endotelinas y péptidos natriuréticos en CCR

Los FCA, adenomas y adenocarcinomas están compuestos de proporciones variables de células cancerosas y estromales. Las células estromales consisten en fibroblastos, células endoteliales vasculares y células inmunes. Recientemente, han surgido nuevas investigaciones que clarifican una multiplicidad de aspectos relacionados con las interacciones tumor – estroma. A continuación, se discute como las ET y los PN actuarían en el complejo escenario que describe el desarrollo del CCR, teniendo en cuenta tanto las células normales como las tumorales.

6.2.5.1 Rol de las ET y los PN en la interacción tumor-estroma

En el modelo carcinógeno AOM/SSD, los tumores exhiben alteraciones de señalización marcadas por la activación de la vía canónica Wnt [326]. Así, la expresión aberrante de β -catenina ha sido reportada por inmunohistoquímica en neoplasmas de colon y displasias en cánceres inflamatorios colónicos de roedores [327] y humanos [328]. La presencia de mutaciones en el gen de β -catenina podría explicar la tinción inmunohistoquímica alterada de la β -catenina en neoplasias colónicas, así como displasias desarrolladas dentro de las 12 semanas posteriores al inicio del tratamiento con AOM/SSD [1].

La activación constitutiva de la vía de β -catenina es responsable de la iniciación de la mayoría de los cánceres de colon [329]. Debido a que dentro del promotor del gen EDN1 hay un elemento cognado del TCF4 de β -catenina, éste también se encuentra bajo la regulación directa de β -catenina en células colónicas cancerosas *in vivo* [329]. Así, la inhibición de la señalización de β -catenina resulta en una disminución de la expresión de EDN1, mientras que su potenciación conduce a una activación del gen. En humanos, el 80% de los cánceres primarios de colon exhiben una elevación significativa de la expresión de EDN1, lo que concuerda con el hallazgo que éste es un objetivo directo de β -catenina. Así, se ha demostrado que la inhibición de la señalización de β -catenina provoca la activación de EDN1 y el rescate de las células cancerosas colónicas de la detención del crecimiento y la apoptosis, lo que implica un papel clave de EDN1 en la promoción de la función oncogénica de β -catenina [329].

En este sentido, en la presente tesis se encontró que en condiciones normales, se da una mayor expresión de ET-1 en colon distal, lo que promovería una mayor actividad del sistema Wnt/ β -catenina en este segmento, y en consecuencia constituiría un factor que promueve la creación de un microambiente más ácido, en relación al colon proximal, lo que se corrobora con las tinciones de PAS/AA. De particular interés resulta el hecho que en el modelo de CCR inducido con AOM/SSD no se observó un aumento significativo de ET-1 en el segmento distal del colon tumoral. Más aún, a partir de la decimosexta semana posterior a la inducción del CCR, la expresión génica de ET-1 cae en este segmento, aunque como se mencionó en la sección 6.2.3, al encontrarse disminuidos los niveles de expresión del receptor ET_B es posible que la depuración de ET-1 se encuentre disminuida. Esto sugiere que el péptido activo podría tener un mayor tiempo de vida media. Esto, sumado a los incrementos del receptor ET_A, permitiría la potenciación de los efectos de dicho péptido en el CCR. En este contexto, la expresión de ANP se mantiene constante mientras que la de CNP aumenta considerablemente.

Para explicar esta paradoja, resulta necesario analizar más profundamente el contexto de estas interacciones. Así, se han descrito mecanismos de acción en los que ANP es capaz de inhibir la señalización de Wnt/ β -catenina, desencadenando el aumento de la acidez intracelular mediada

por el intercambiador de sodio-protones 1 (NHE-1) [330]. En este trabajo, los resultados del análisis comparativo de ANP y EIPA (un inhibidor específico de NHE-1) mostraron que ambas moléculas afectan tanto a la acidificación intracelular como la cascada de señalización Wnt/ β -catenina. Específicamente, el ANP actúa en la parte superior de la cascada, a través de una activación mediada por Frizzled [330]. En los tumores sólidos, la alcalinización intracelular y la acidificación del microambiente, juegan un papel crucial en la proliferación celular [331], la invasión y la metástasis [332], así como la resistencia a los fármacos [333] y la apoptosis [334]. Específicamente, se demostró que la alcalinización citoplasmática es un evento temprano en la transformación tumorigénica promovido por la estimulación del NHE-1. Dicho intercambiador aparentemente es el principal sistema que regula la homeostasis del pH en el microambiente extracelular del cáncer, que en condiciones normales posee carácter ácido [335].

En los tejidos cancerosos, los fibroblastos son morfológicamente similares a los miofibroblastos, células ahusadas grandes que se diferencian durante los procesos de cicatrización de heridas [336]. Los fibroblastos, que son los principales componentes del estroma, se activan durante la cicatrización de heridas y retrotraen su fenotipo celular, cuando se completa el proceso [337]. Por el contrario, los fibroblastos asociados al cáncer (FAC) se mantienen perpetuamente activados, sin retornar al fenotipo normal, ni sufrir apoptosis [338]. Una teoría común de los orígenes de los FAC apunta a los fibroblastos residentes del tejido. Los FAC contribuyen a la proliferación, invasión y metástasis tumoral a través de la secreción de diversos factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas [339], 00 proliferación vía el receptor ET_A, la migración mediada por el receptor ET_B y la contracción vía ambos receptores [340]. Adicionalmente, ET-1 promueve el incremento de los niveles de proteínas modificadoras de la matriz extracelular (MEC) tales como TIMP-1 y MMP-2, aunque no tiene efecto sobre la expresión de MMP-3 [340]. Tanto MMP-2 como MMP-9 actúan degradando selectivamente al colágeno tipo IV y a laminina, constituyentes de la membrana basal y que juegan un rol fundamental en los procesos de proliferación tumoral [315]. Para que se produzca la invasión y la metástasis, es necesaria la remoción de estos constituyentes de la matriz. En los estudios de microscopia de SHG, aquí presentados, pudo visualizarse que conforme se inicia el proceso tumoral del CCR se produce un profundo rearrreglo de la matriz de colágeno, así como una disminución de su grado de ordenamiento. Estudios recientes han demostrado que las células cancerosas pueden promover la conversión a FAC por reprogramación de los fibroblastos mediada por miARNs (miR-31, miR-214 y miR-155) [341]. Otros factores que promueven la conversión de fibroblastos en miofibroblastos con alto potencial migratorio, son las especies reactivas de oxígeno (ROS). Dicho proceso estaría mediado por la acumulación del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1 α) y la quimioquina CXCL12 [342]. En condiciones normales, se ha hipotetizado que fundamentalmente la isoforma ET-2 estaría asociada al

fenotipo de fibroblastos planos, los cuales son favorecidos en su contractibilidad citoplasmica y en el mantenimiento de la tensión. La ausencia de ET-2 desde los inicios del desarrollo de la patología actuaría promoviendo la transformación al fenotipo de fibroblastos con forma de estrella, los que están desfavorecidos para tal respuesta.

Por el contrario, CNP estaría involucrado en los mecanismos que inhiben la activación de miofibroblastos. Así, se ha demostrado que CNP inhibe la proliferación de células estrelladas miofibroblásticas hepáticas [343] y la proliferación de fibroblastos [344]. Los fibroblastos además expresan el receptor peptídico natriurético B (NPR-B) [344]. La administración de CNP previene la fibrosis de la neointima de las arterias así como la proliferación de las células del músculo liso arterial posterior a la angioplastia [345], [346]. Por otro lado, se ha demostrado que CNP inhibe el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la proliferación de las células musculares lisas arteriales inducida por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) [347]. En los trabajos de Surendran y Simon, se determinó que el gen de CNP endógeno (*Nppc*), es inducido en el epitelio tubular renal y posteriormente en los miofibroblastos intersticiales luego de una obstrucción ureteral unilateral [348]. Dicha inducción ocurre en poblaciones celulares idénticas a aquellas en las que *Wnt4* es inducido luego de una lesión renal. Adicionalmente, *Nppc* es activado en células que expresan *Wnt4*, durante la nefrogénesis [348]. Estos hallazgos sugieren que *Nppc* es estimulado por *Wnt4* de una manera dependiente de TCF/LEF como resultante de una lesión renal y, por lo tanto, podría contribuir a limitar los procesos de fibrosis renal [348].

En cultivos de fibroblastos cardíacos de ratas adultas, el TGF- β 1, el FGF básico y la ET-1 mostraron estimular significativamente la secreción de CNP. Mediante análisis de *Northern blot* se detectó ARNm de CNP y su receptor específico (guanilil ciclasa-B) en fibroblastos cardíacos [349]. El CNP es un factor estimulante, de mayor potencia que ANP y BNP en la producción de GMPc intracelular fibroblástico. Adicionalmente, es un inhibidor de la replicación del ADN, así como de la síntesis de colágeno de los fibroblastos cardíacos, y estos efectos inhibitorios son superiores que los ejercidos por ANP y BNP. Dichos procesos de inhibición de la síntesis de ADN y de colágeno por parte de CNP, se reproducen con el empleo de 8-bromo GMPc, un análogo de este nucleótido cíclico [349]. Sin embargo, en miocitos cardíacos, se ha observado que los efectos inhibitorios de CNP sobre la respuesta hipertrofica, disminuyeron significativamente las altas concentraciones de ET-1 [350]. En este trabajo, se demuestra que mientras CNP promueve el incremento de los niveles intracelulares de GMPc en los miocitos, ET-1 suprime la acumulación celular de GMPc inducida por CNP. Adicionalmente, CNP inhibe la hipertrofia de miocitos cardíacos inducida por ET-1 a través de un mecanismo dependiente de GMPc y, a la inversa, ET-1 inhibe la señalización de CNP por un mecanismo dependiente de

proteína quinasa C y Ca^{2+} , sugiriendo interferencia mutua entre las vías de señalización de CNP y ET-1 [350].

En base a estas observaciones, en colon, la activación de la vía Wnt/ β -catenina promovería el incremento de la expresión de ET-1, favoreciendo la alcalinización intracelular y los efectos cancerígenos que ésta acarrea. El desbalance de los receptores de las ET, actuaría potenciando y retroalimentando este proceso. Conjuntamente, ANP y ET-1 serían responsables del control de la acidez celular y del microambiente tumoral aunque, ante una reacción exacerbada, este mecanismo se regularía por inducción del gen de CNP, el cual limitaría la activación y proliferación de los fibroblastos, ejerciendo de esta manera un rol homeostático (Figura 57).

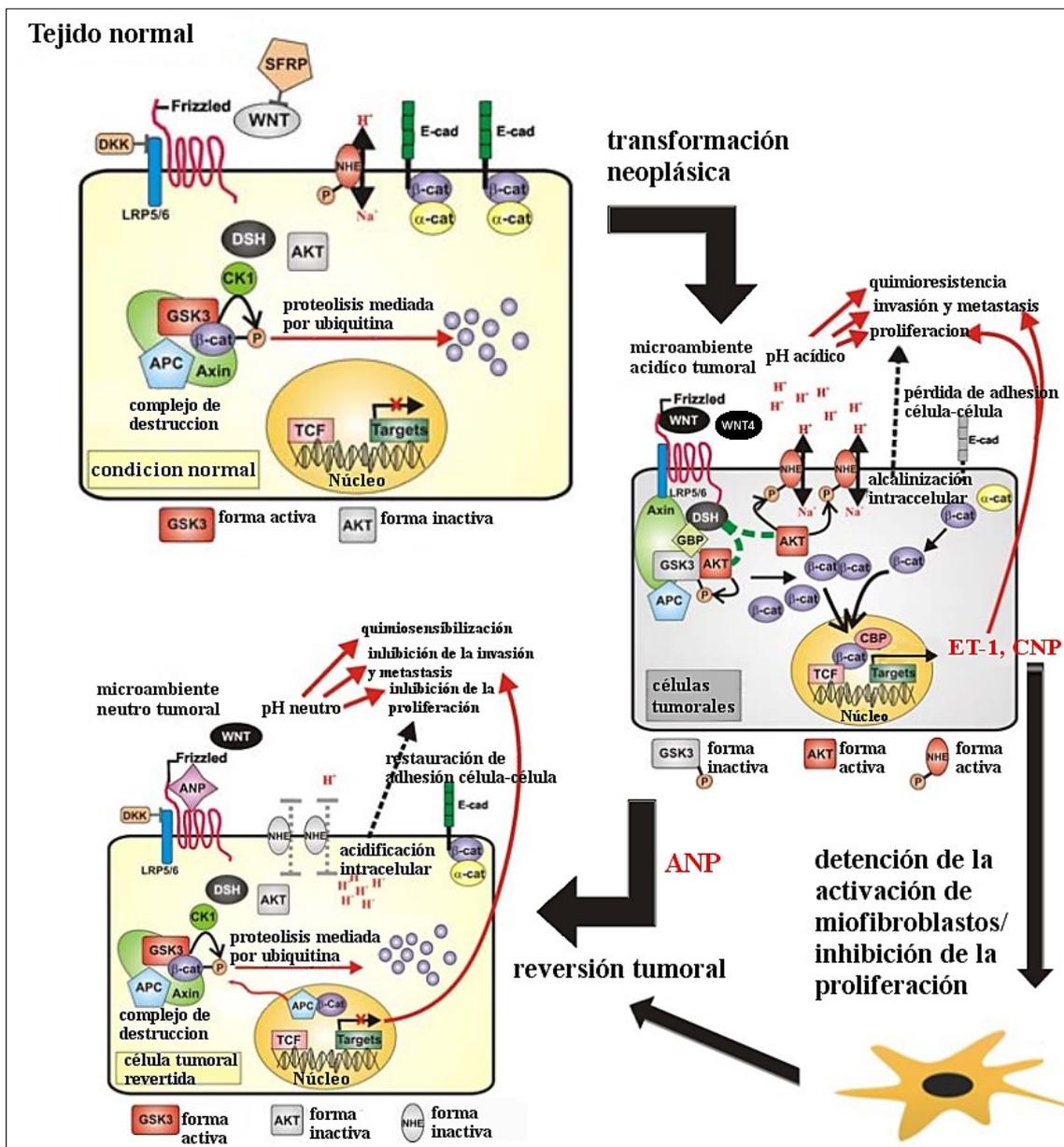


Figura 57. Esquema propuesto para el mecanismo de acción de ET-1, ANP y CNP. Este mecanismo implica un diálogo cruzado entre el pH intracelular regulado por NHE-1 y la señalización de Wnt. APC:

poliposis adenomatosa coli; AKT: proteína quinasa serina/treonina; β -cat: β -catenina; CBP: proteína de unión a CREB; CK: caseína quinasa; DKK: *Dickkopf*; DSH: *Dishevelled*; GBP: proteína de unión a GSK3; GSK: glucógeno sintasa quinasa; LRP: proteína relacionada con el receptor LDL; NHE: Intercambiador de sodio/protón; P: fosforilación; TCF: factor de células T; (Figura modificada de Serafino y col., 2014).

6.2.5.2 Rol de las ET y de los PN en el sistema inmune

La respuesta inmunitaria contra el desarrollo del cáncer por destrucción eficaz de las células cancerosas, depende del inicio de una secuencia de sucesos que deben proceder y expandirse iterativamente [351]. Estos son actualmente definidos como Ciclo Inmunidad-Cáncer (Figura 58). La primera etapa implica la liberación de neoantígenos generados por el proceso oncogénico, seguido de su captura y procesamiento por las células dendríticas (CD). La respuesta de células T anticáncer, requiere la presencia de un conjunto de señales que especifican la inmunidad y evitan la inducción de la tolerancia periférica a los antígenos tumorales. Tales señales inmunogénicas incluyen citoquinas proinflamatorias y factores liberados por células tumorales moribundas o por la microbiota intestinal. En la continuidad del proceso, las CD presentan a las células T los antígenos capturados en las moléculas de los complejos mayores de histocompatibilidad I y II (CMHI y CMHII) (paso 2). Esto resulta en el cebado y la activación de la respuesta de las células T efectoras contra los antígenos cancerosos específicos (paso 3), que son reconocidos como extraños, o contra los cuales la tolerancia central ha sido incompleta. En esta etapa, la naturaleza de la respuesta inmune se determina por el equilibrio crítico que representa la relación de las células T efectoras versus las células T reguladoras, claves para el resultado final. Por último, las células T efectoras activadas migran hacia el lecho tumoral (paso 4), lo infiltran (paso 5), reconociendo y uniéndose específicamente a células cancerosas a través de la interacción del receptor de células T (TCR) y su antígeno cognado unido a CMHI (paso 6). El proceso culmina con la eliminación de la célula cancerosa (paso 7). Su muerte provoca la liberación adicional de antígenos tumorales (reinicio del paso 1), amplificando y profundizando la respuesta en las subsiguientes revoluciones del ciclo [351]. En los pacientes que padecen cáncer, el Ciclo Inmunidad-Cáncer se encuentra alterado y pierde su óptimo funcionamiento. Los antígenos tumorales pueden tornarse indetectables, las CD y las células T pueden reconocer a los antígenos generados como propios y por lo tanto, las respuestas de células T son reguladoras, en lugar de efectoras. Las células T pueden ser inhibidas, evitando la infiltración del tumor o alternativamente, en el microambiente tumoral podrían generarse diversos factores supresores de las células efectoras, impidiendo contrarrestar el proceso [352].

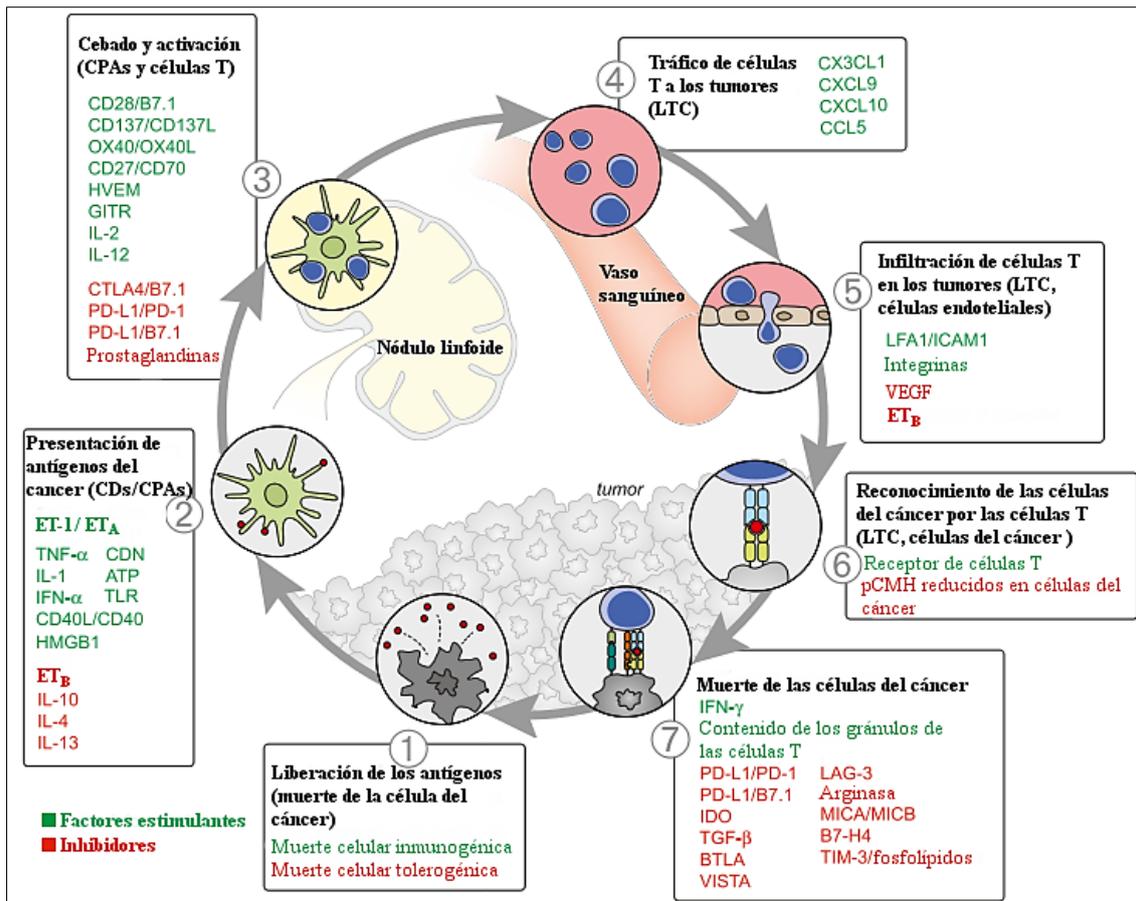


Figura 58. Esquema del ciclo de inmunidad-cáncer. La generación de inmunidad al cáncer es un proceso cíclico que puede propagarse por sí mismo, llevando a una acumulación de factores inmunoestimuladores (en verde) que en principio amplificarían las respuestas de las células T. El ciclo también se caracteriza por factores inhibidores (en rojo) que conducen a mecanismos de retroalimentación reguladora inmune, que pueden detener el desarrollo o limitar la inmunidad. Este ciclo se puede dividir en siete etapas principales, comenzando con la liberación de antígenos de las células cancerosas y terminando con la muerte de las mismas. Cada etapa se describe con los tipos de células primarias implicadas y la ubicación anatómica de la actividad enumerada. Las abreviaturas son las siguientes: CD: células dendríticas, CPA: células presentadoras de antígeno; LTC: linfocitos T citotóxicos, IL: interleuquina; TNF: factor de necrosis tumoral; IFN: interferón; CDN: dinucleótido cíclico; ATP: trifosfato de adenosina; HMGB1: proteína de grupo B1 de alta movilidad; TLR: receptor tipo Toll; HVEM: mediador de la entrada del virus del herpes; GITR: gen relacionado con la familia TNFR inducido por glucocorticoides; CTLA4: antígeno-4 de linfocito T citotóxico; PD-L1: ligando de muerte programada 1; CXCL/CCL: ligandos de motivos de quimioquinas; LFA1: antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos; ICAM1: molécula de adhesión intracelular 1; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular;IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa; TGF: factor de crecimiento transformante; BTLA: atenuador de linfocitos B y T; VISTA: supresor Ig de dominio V de la activación de células T; LAG – 3: proteína del gen 3 de activación de linfocitos; MIC: proteína de secuencia relacionada con el polipéptido de clase I del CMH; TIM–3: dominio de inmunoglobulina de células T y dominio 3 de mucina. Aunque no se ilustra, es importante observar que las células T intratumorales reguladoras, los macrófagos y las células supresoras derivadas de mieloides son fuentes clave de muchos de estos factores inhibidores; (Figura modificada de Chen y col., 2013).

En la presente tesis se observó un incremento significativo en número y tamaño de los infiltrados linfoides que, en colon distal patológico, expresan tanto los componentes del sistema de las ET como los PN. Las CD producen grandes cantidades de ET-1 después de la estimulación con TNF-α o *S. aureus* inactivado, con aumento concomitante en la expresión de

los receptores ET_A y ET_B [353]. Asimismo, se ha probado que el bloqueo selectivo del receptor ET_A provoca la reducción significativa de la expresión del marcador de CD maduras CD83, así como de la producción de la citoquina inmunoestimuladora IL-12, y con ésta, la habilidad de las CD para estimular células T y promoviendo su apoptosis [353]. La IL-12 promueve la proliferación y la actividad de las células T asesinas naturales y desempeña un papel central en la promoción de las respuestas de células T auxiliares de tipo 1 (TH1) [354]. Su producción por células presentadoras de antígenos parece ser esencial para la defensa del huésped contra las infecciones microbianas intracelulares y el control de la malignidad [355], [356]. Las alteraciones en su producción pueden afectar la competencia del sistema inmune. Por otra parte, el bloqueo selectivo del receptor ET_B, da como resultado el efecto opuesto en relación con el aumento de la expresión de CD83 y la consecuente mejora de la supervivencia de las CD [353]. Por lo tanto, los bucles autocrinos/paracrinos ET-1/ET_A/ET_B en las CD resultan esenciales para su maduración y normal funcionamiento. Adicionalmente, los estudios que analizan el perfil transcripcional de células endoteliales de cáncer de ovario humano revelan que la sobreexpresión del receptor ET_B se asocia con la ausencia de linfocitos infiltrantes de tumores, con cortos tiempos de supervivencia del paciente [357]. En el mismo trabajo, se demostró que el inhibidor de ET_B, BQ-788 incrementa la capacidad adhesiva de las células T al endotelio *in vitro*, efecto que es contrarrestado por el bloqueo de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) o el tratamiento con donantes de NO. En ratones, la neutralización de ET_B por BQ-788 provoca el aumento del retorno de células T a tumores; este reclutamiento requirió ICAM-1 [357]. ET-2 es un quimioatrayente para macrófagos y monocitos THP-1, pero no para los monocitos recién aislados. Los experimentos con antagonistas de receptor de ET mostraron que la migración promovida por ET-2 está mediada por el receptor ET_B. La expresión de ET-2 en los tumores puede modular el comportamiento de los macrófagos, de modo que las células activadas se acumulan en áreas de hipoxia [154]. Estas funciones estarían comprometidas desde el inicio del desarrollo del CCR debido al silenciamiento temprano de ET-2.

Por otra parte, el ANP también puede actuar como factor autócrino/parácrino, modulando varias funciones inmunitarias, así como ejercer efectos citoprotectores [358]. Así, el ANP contribuiría a que la inmunidad innata sea capaz de: (i) estimular la defensa del huésped contra microbios extracelulares por fagocitosis y liberación de EROs [359]–[361]; (ii) inhibir la síntesis y liberación de marcadores proinflamatorios tales como TNF- α , IL-1, MCP-1, NO, ciclooxigenasa-2 (COX-2) [358]; (iii) inhibir la expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 y E-selectina [362]. Este péptido puede asimismo afectar la inmunidad adaptativa siendo capaz de: (i) reducir el número de linfocitos CD4⁺-CD8⁺, así como aumentar los CD4-CD8; (ii) estimular la diferenciación de células CD4⁺ naïve hacia el fenotipo TH2 y/o TH17 [358]. En el caso de CNP, no existe información concluyente sobre su rol en el sistema inmune

adaptativo, aunque como se discutió en la sección 6.1.3.4, sí se ha probado su participación en el sistema inmune innato [276].

En función con lo descripto, el aumento de la expresión génica de ET_A que se observa en colon proximal y la disminución de ET_B en colon distal en la cuarta semana de inducción del CCR, permitiría postular que el sistema de las ET promovería la maduración de las CD, así como la producción de IL-12, procesos que a su vez desencadenarían la respuesta de linfocitos TH1. Adicionalmente, la disminución de la expresión génica de ET_B, favorecería la infiltración de linfocitos T en las lesiones y tumores, lo que fue claramente evidenciado tanto en las tinciones histológicas como en las reacciones de inmunofluorescencia y a su vez, aumentaría el tiempo de vida media de los ligandos del sistema de las ET, potenciando sus efectos. En paralelo, el silenciamiento de ET-2 evitaría la activación y migración de macrófagos hacia zonas hipóxicas. El punto máximo de respuesta del eje ET-1/ET_A se da en la octava semana posterior a la inducción del CCR, cuando el aumento en la expresión génica de ET_A y la disminución de ET_B con respecto al tejido normal, se observa en ambos segmentos del colon. En la decimosexta semana posterior a la inducción del CCR, se observa una reexpresión de ET_A en colon proximal y concomitantemente una disminución de ET-1 en colon distal. En contraposición con ésto, el aumento de la expresión génica de CNP en colon distal se torna significativo, lo que probablemente pueda relacionarse con la disminución de la expresión de ET-1.

6.2.6 MNL como herramienta para la detección temprana del CCR

Actualmente, el examen histo-patológico basado en las tinciones de H&E sigue siendo el *gold estándar* para el diagnóstico del cáncer colorrectal. El proceso implica la extracción de tejido, la fijación en formalina, la inclusión en parafina, el seccionamiento, la tinción con hematoxilina y eosina y finalmente el examen microscópico. Este procedimiento presenta muchos inconvenientes, entre los que se cuentan el costo, el tiempo de demora para la obtención de los resultados y el propio proceso quirúrgico excisional con sus riesgos inherentes (sangrado o perforación) [312]. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas tecnologías de imágenes puede cooperar en la resolución diagnóstica anátomo-patológica. Aunque existen nuevas técnicas de examen, como la tomografía computada, la tomografía por emisión de positrones, la resonancia magnética, la ecografía endorrectal éstas también presentan muchas debilidades como la falta de resolución o la necesidad incorporar agentes de contraste exógenos [363]. Recientemente, la endomicroscopía confocal ha demostrado la capacidad resolver los detalles histológicos durante la endoscopia en curso, pero la utilidad de esta modalidad de imagen en pacientes es limitada porque requiere la administración de colorantes fluorescentes [364], [365]. Para superar este conjunto de problemas, el desarrollo de las técnicas de microscopía no lineal podría constituirse en una solución. En primer lugar, la fluorescencia de excitación de dos fotones (TPEF), la

generación de segundo armónico (SHG), la generación de tercer armónico (THG) y la microscopía de Dispersión Raman Coherente Anti-Stokes (CARS) presentan algunas ventajas para el diagnóstico. No requieren coloración, ofrecen una resolución tridimensional inherente, una excitación cercana al infrarrojo lo que permite niveles penetración óptica superiores a las técnicas histológicas convencionales y fotodaño prácticamente nulo. Adicionalmente, estas técnicas son capaces de proporcionar información cuantitativa [366], [367]. En los últimos años, estos métodos han demostrado ser eficientes para el diagnóstico de diversos tipos de cánceres [368]–[372], incluyendo CCR [373]–[376].

Con el objetivo de caracterizar el tejido colonico normal y durante el desarrollo del CCR, se empleó la combinación de imágenes de SHG, para identificar modificaciones en el ordenamiento de fibras de colágeno y TPEF, para el reconocimiento de estructuras propias del tejido. Tales observaciones se realizaron mediante comparaciones de muestras histológicas teñidas con H&E para corroborar lo observado en las mismas. El procesamiento de las imágenes permitió observar que los cambios en el ordenamiento de las fibras colágenas ocurren tempranamente en la patología y dichas alteraciones se mantienen a lo largo de la misma. En un trabajo reciente, se demostró que la combinación de las tres modalidades de imagen no lineal libre de tinción: CARS, TPEF y SHG proporciona información que puede ser traducida a imágenes computacionales de hematoxilina y eosina, por estadística multivariante [377]. De esta manera, se generan imágenes pseudoteñidas de H&E las que permiten la identificación de regiones sospechadas de algún grado patológico. Estas últimas se analizan adicionalmente mediante espectroscopia Raman recuperando la huella dactilar molecular del tejido. Los autores sugieren que dicha combinación multimodal posee potencial como una herramienta precisa y rápida en la histopatología de rutina. Como ventaja clave, ambos métodos ópticos no son invasivos y permiten investigaciones patológicas adicionales de la misma sección de tejido, por ejemplo una comparación directa con el patrón *gold estándar* actual [377]. Alternativamente, otro estudio ha demostrado la viabilidad de utilizar microscopía multifotónica para hacer en tiempo real, diagnósticos ópticos para los márgenes quirúrgicos en el cáncer de recto bajo [378].

A su vez, el hecho de que las técnicas no lineales permitan alcanzar altos niveles de penetración, manteniendo niveles de resolución apropiados, permite generar seccionamientos 3D de la muestra [379]. Estas características, sumadas a los estudios de procesamiento de las imágenes, que aseguran la detección de las diferencias prematuras en tejidos alterados, refuerzan la idea de que, en un futuro cercano, con la miniaturización y la integración a la colonoscopia, la microscopía no lineal podría utilizarse como una potente herramienta endoscópica para generar biopsias ópticas 3D, *in vivo* y no invasivas.

7. Bibliografía

- [1] T. Tanaka, H. Kohno, R. Suzuki, Y. Yamada, S. Sugie, and H. Mori, "A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate," *Cancer Sci.*, vol. 94, no. 11, pp. 965–973, Nov. 2003.
- [2] Instituto Nacional del Cáncer, Ministerio de Salud de la Nación, "www.msal.gov.ar," "Diagnóstico situacional del cáncer colorrectal en Argentina. Organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control. Propuesta de programa", 2012. .
- [3] K. Grant, M. Loizidou, and I. Taylor, "Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer," *Br. J. Cancer*, vol. 88, no. 2, pp. 163–166, Jan. 2003.
- [4] J. Nelson, A. Bagnato, B. Battistini, and P. Nisen, "The endothelin axis: emerging role in cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 2, pp. 110–116, Feb. 2003.
- [5] D. L. Vesely, "Cardiac hormones for the treatment of cancer," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 20, no. 3, pp. R113–R125, Jun. 2013.
- [6] D. L. Vesely, "Natriuretic Peptides' Metabolic Targets for Treatment of Cancer," *J. Investig. Med.*, vol. 61, no. 5, pp. 816–822, Jun. 2013.
- [7] D. L. Vesely, "Family of peptides synthesized in the human body have anticancer effects," *Anticancer Res.*, vol. 34, no. 4, pp. 1459–1466, Apr. 2014.
- [8] A. Inoue *et al.*, "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, no. 8, pp. 2863–2867, Apr. 1989.
- [9] M. Sokolovsky, "Structure-Function Relationships of Endothelins, Sarafotoxins, and Their Receptor Subtypes," *J. Neurochem.*, vol. 59, no. 3, pp. 809–821, Sep. 1992.
- [10] C. Plumpton, M. J. Ashby, R. E. Kuc, G. O'Reilly, and A. P. Davenport, "Expression of endothelin peptides and mRNA in the human heart," *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979*, vol. 90, no. 1, pp. 37–46, Jan. 1996.
- [11] W. G. Haynes and D. J. Webb, "Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 344, no. 8926, pp. 852–854, Sep. 1994.
- [12] H. Yanagisawa, R. E. Hammer, J. A. Richardson, S. C. Williams, D. E. Clouthier, and M. Yanagisawa, "Role of Endothelin-1/Endothelin-A receptor-mediated signaling pathway in the aortic arch patterning in mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 102, no. 1, pp. 22–33, Jul. 1998.
- [13] H. Matsumoto, N. Suzuki, H. Onda, and M. Fujino, "Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 164, no. 1, pp. 74–80, Oct. 1989.
- [14] A. Giaid *et al.*, "Expression of endothelin-like peptide in the nervous system of the marine mollusk *Aplysia*," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 17 Suppl 7, pp. S449–451, 1991.
- [15] T. Uchide, J. Adur, T. Fukamachi, and K. Saida, "Quantitative analysis of endothelin-1 and vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 gene expression in rats by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 36, no. 5 Suppl 1, pp. S5–8, Nov. 2000.
- [16] S. M. de la Monte, T. Quertermous, C. C. Hong, and K. D. Bloch, "Regional and maturation-associated expression of endothelin 2 in rat gastrointestinal tract," *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, vol. 43, no. 2, pp. 203–209, Feb. 1995.

- [17] S. Takizawa *et al.*, “Differential expression of endothelin-2 along the mouse intestinal tract,” *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 35, no. 2, pp. 201–209, Oct. 2005.
- [18] K. Saida, Y. Mitsui, and N. Ishida, “A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 25, pp. 14613–14616, Sep. 1989.
- [19] www.informatics.jax.org, *www.informatics.jax.org*. [Online]. Available: <http://www.informatics.jax.org>.
- [20] D. E. Kohan, N. F. Rossi, E. W. Inscho, and D. M. Pollock, “Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin,” *Physiol. Rev.*, vol. 91, no. 1, pp. 1–77, Jan. 2011.
- [21] M. B. Shapiro and P. Senapathy, “RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 15, no. 17, pp. 7155–7174, Sep. 1987.
- [22] A. J. Turner and L. J. Murphy, “Molecular pharmacology of endothelin converting enzymes,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 51, no. 2, pp. 91–102, Jan. 1996.
- [23] N. Emoto and M. Yanagisawa, “Endothelin-converting Enzyme-2 Is a Membrane-bound, Phosphoramidon-sensitive Metalloprotease with Acidic pH Optimum,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 25, pp. 15262–15268, Jun. 1995.
- [24] L. Ling, J. J. Maguire, and A. P. Davenport, “Endothelin-2, the forgotten isoform: emerging role in the cardiovascular system, ovarian development, immunology and cancer,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 168, no. 2, pp. 283–295, Jan. 2013.
- [25] E. Y. S. Yap, B. Battistini, and K. O. McKay, “Contraction to big endothelin-1, big endothelin-2 and big endothelin-3, and endothelin-converting enzyme inhibition in human isolated bronchi,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 129, no. 1, pp. 170–176, Jan. 2000.
- [26] F. D. Russell, J. N. Skepper, and A. P. Davenport, “Evidence using immunoelectron microscopy for regulated and constitutive pathways in the transport and release of endothelin,” *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 31, no. 3, pp. 424–430, Mar. 1998.
- [27] J. Vijayaraghavan, A. G. Scicli, O. A. Carretero, C. Slaughter, C. Moomaw, and L. B. Hersh, “The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase),” *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 24, pp. 14150–14155, Aug. 1990.
- [28] K. Itoh, R. Kase, M. Shimmoto, A. Satake, H. Sakuraba, and Y. Suzuki, “Protective protein as an endogenous endothelin degradation enzyme in human tissues,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 2, pp. 515–518, Jan. 1995.
- [29] H. L. Jackman, P. W. Morris, P. A. Deddish, R. A. Skidgel, and E. G. Erdős, “Inactivation of endothelin I by deamidase (lysosomal protective protein),” *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 5, pp. 2872–2875, Feb. 1992.
- [30] M. Kohno *et al.*, “Prolonged blood pressure elevation after endothelin administration in bilaterally nephrectomized rats,” *Metabolism.*, vol. 38, no. 8, pp. 712–713, Aug. 1989.
- [31] Z. A. Abassi, J. E. Tate, E. Golomb, and H. R. Keiser, “Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin,” *Hypertens. Dallas Tex* 1979, vol. 20, no. 1, pp. 89–95, Jul. 1992.
- [32] H. Arai, K. Hosoda, G. Shirakami, T. Yoshimasa, and K. Nakao, “[Molecular biology of endothelins and endothelin receptors].,” *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.*, vol. 51, no. 6, pp. 1530–1539, Jun. 1993.

- [33] H. F. Cheng, Y. M. Su, J. R. Yeh, and K. J. Chang, "Alternative transcript of the nonselective-type endothelin receptor from rat brain," *Mol. Pharmacol.*, vol. 44, no. 3, pp. 533–538, Sep. 1993.
- [34] K. Hosoda *et al.*, "Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 26, pp. 18797–18804, Sep. 1992.
- [35] T. Mizuno *et al.*, "Structure of the bovine ETB endothelin receptor gene," *Biochem. J.*, vol. 287 (Pt 1), pp. 305–309, Oct. 1992.
- [36] N. Hatae, N. Aksentijevich, H. W. Zemkova, K. Kretschmannova, M. Tomic, and S. S. Stojilkovic, "Cloning and functional identification of novel endothelin receptor type A isoforms in pituitary," *Mol. Endocrinol. Baltim. Md*, vol. 21, no. 5, pp. 1192–1204, May 2007.
- [37] H. Arai, S. Hori, I. Aramori, H. Ohkubo, and S. Nakanishi, "Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor," *Nature*, vol. 348, no. 6303, pp. 730–732, Dec. 1990.
- [38] T. Sakurai *et al.*, "Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor," *Nature*, vol. 348, no. 6303, pp. 732–735, Dec. 1990.
- [39] V. Shyamala, T. Moulthrop, J. Stratton-Thomas, and P. Tekamp-Olson, "Two distinct human endothelin B receptors generated by alternative splicing from a single gene.," *Cell. Mol. Biol. Res.*, vol. 40, no. 4, pp. 285–296, 1994.
- [40] N. A. Elshourbagy, J. E. Adamou, A. W. Gagnon, H.-L. Wu, M. Pullen, and P. Nambi, "Molecular Characterization of a Novel Human Endothelin Receptor Splice Variant," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 41, pp. 25300–25307, Oct. 1996.
- [41] Z. Shraga-Levine and M. Sokolovsky, "Functional role for glycosylated subtypes of rat endothelin receptors," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 246, no. 2, pp. 495–500, May 1998.
- [42] S. Karne, C. K. Jayawickreme, and M. R. Lerner, "Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores.," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 25, pp. 19126–19133, Sep. 1993.
- [43] C. Kumar *et al.*, "Cloning and characterization of a novel endothelin receptor from *Xenopus* heart.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 18, pp. 13414–13420, May 1994.
- [44] N. O. Dulin, A. Sorokin, E. Reed, S. Elliott, J. H. Kehrl, and M. J. Dunn, "RGS3 Inhibits G Protein-Mediated Signaling via Translocation to the Membrane and Binding to $G\alpha_{11}$," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 714–723, Jan. 1999.
- [45] T. Imamura *et al.*, "beta -Arrestin-mediated recruitment of the Src family kinase Yes mediates endothelin-1-stimulated glucose transport," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 47, pp. 43663–43667, Nov. 2001.
- [46] K. Kitamura, N. Shiraishi, W. D. Singer, M. E. Handlogten, K. Tomita, and R. T. Miller, "Endothelin-B receptors activate $G\alpha_{13}$," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 276, no. 4, pp. C930–C937, Apr. 1999.
- [47] S. Goruppi, J. V. Bonventre, and J. M. Kyriakis, "Signaling pathways and late-onset gene induction associated with renal mesangial cell hypertrophy," *EMBO J.*, vol. 21, no. 20, pp. 5427–5436, Oct. 2002.
- [48] A. Sorokin and D. E. Kohan, "Physiology and pathology of endothelin-1 in renal mesangium," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 285, no. 4, pp. F579–589, Oct. 2003.

- [49] E. I. Boesen, "Endothelin ETB receptor heterodimerization: beyond the ETA receptor," *Kidney Int.*, vol. 74, no. 6, pp. 693–694, Sep. 2008.
- [50] B. Gregan, M. Schaefer, W. Rosenthal, and A. Oksche, "Fluorescence resonance energy transfer analysis reveals the existence of endothelin-A and endothelin-B receptor homodimers.," *J Cardiovasc Pharmacol.*, vol. 44, pp. S30-3, 2004.
- [51] B. Gregan *et al.*, "Ligand-dependent Differences in the Internalization of Endothelin A and Endothelin B Receptor Heterodimers," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 26, pp. 27679–27687, Jun. 2004.
- [52] N. J. Evans and J. W. Walker, "Sustained Ca²⁺ signaling and delayed internalization associated with endothelin receptor heterodimers linked through a PDZ finger," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 86, no. 8, pp. 526–535, Aug. 2008.
- [53] C. Zeng, U. Hopfer, L. D. Asico, G. M. Eisner, R. A. Felder, and P. A. Jose, "Altered AT1 receptor regulation of ETB receptors in renal proximal tubule cells of spontaneously hypertensive rats," *Hypertens. Dallas Tex 1979*, vol. 46, no. 4, pp. 926–931, Oct. 2005.
- [54] C. Zeng *et al.*, "Renal D3 dopamine receptor stimulation induces natriuresis by endothelin B receptor interactions," *Kidney Int.*, vol. 74, no. 6, pp. 750–759, Sep. 2008.
- [55] L. R. Stow, M. E. Jacobs, C. S. Wingo, and B. D. Cain, "Endothelin-1 gene regulation," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 25, no. 1, pp. 16–28, Jan. 2011.
- [56] E. Belaidi, M. Joyeux-Faure, C. Ribuot, S. H. Launois, P. Levy, and D. Godin-Ribuot, "Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 53, no. 15, pp. 1309–1317, Apr. 2009.
- [57] H.-H. Chao *et al.*, "Leptin stimulates endothelin-1 expression via extracellular signal-regulated kinase by epidermal growth factor receptor transactivation in rat aortic smooth muscle cells," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 573, no. 1–3, pp. 49–54, Nov. 2007.
- [58] R. Corder *et al.*, "Endothelin-1 synthesis reduced by red wine," *Nature*, vol. 414, no. 6866, pp. 863–864, Dec. 2001.
- [59] M. E. Lee, K. D. Bloch, J. A. Clifford, and T. Quertermous, "Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter. Evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 18, pp. 10446–10450, Jun. 1990.
- [60] F. J. Oliver *et al.*, "Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 34, pp. 23251–23256, Dec. 1991.
- [61] F. Rodríguez-Pascual *et al.*, "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates endothelin-1 expression by a novel, redox-sensitive mechanism involving mRNA stability," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 23, pp. 7139–7155, Dec. 2008.
- [62] T. W. Vallender and B. T. Lahn, "Localized methylation in the key regulator gene endothelin-1 is associated with cell type-specific transcriptional silencing," *FEBS Lett.*, vol. 580, no. 18, pp. 4560–4566, Aug. 2006.
- [63] S. Yeligar, H. Tsukamoto, and V. K. Kalra, "Ethanol-induced expression of ET-1 and ET-BR in liver sinusoidal endothelial cells and human endothelial cells involves hypoxia-inducible factor-1 α and microrNA-199," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 183, no. 8, pp. 5232–5243, Oct. 2009.
- [64] T. Arinami *et al.*, "Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 48, no. 5, pp. 990–996, May 1991.

- [65] F. Tokito, N. Suzuki, M. Hosoya, H. Matsumoto, S. Ohkubo, and M. Fujino, "Epidermal growth factor (EGF) decreased endothelin-2 (ET-2) production in human renal adenocarcinoma cells," *FEBS Lett.*, vol. 295, no. 1, pp. 17–21, Dec. 1991.
- [66] G. L. Lambert, S. Barker, and R. Corder, "Comparison of the regulation of endothelin-2 and endothelin-converting enzyme-1 b [correction of beta] by forskolin and TNF-alpha in ACHN cells," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 31 Suppl 1, pp. S49-51, 1998.
- [67] G. L. Lambert, S. Barker, D. M. Lees, and R. Corder, "Endothelin-2 synthesis is stimulated by the type-1 tumour necrosis factor receptor and cAMP: comparison with endothelin-converting enzyme-1 expression," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 24, no. 2, pp. 273–283, Apr. 2000.
- [68] L. P. Gartner, J. L. Hiatt, M. E. Araiza Martínez, and J. Sepúlveda Saavedra, *Texto Atlas de Histología*, Tercera edición. Mexico: McGraw-Hill, 2008.
- [69] K. Takahashi *et al.*, "Endothelin in the gastrointestinal tract. Presence of endothelinlike immunoreactivity, endothelin-1 messenger RNA, endothelin receptors, and pharmacological effect," *Gastroenterology*, vol. 99, no. 6, pp. 1660–1667, Dec. 1990.
- [70] J. F. Adur, "Expresión Génica y Funciones del Péptido Vasoactivo de Contracción Intestinal (Vic/ET-2) y de la Endotelina-1 (Et-1) en Ratón," Thesis, 2008.
- [71] M. Bianchi, J. Adur, S. Takizawa, K. Saida, and V. H. Casco, "Endothelin system in intestinal villi: A possible role of endothelin-2/vasoactive intestinal contractor in the maintenance of intestinal architecture," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 417, no. 4, pp. 1113–1118, Jan. 2012.
- [72] J. L. Wallace, G. Cirino, G. De Nucci, W. McKnight, and W. K. MacNaughton, "Endothelin has potent ulcerogenic and vasoconstrictor actions in the stomach," *Am. J. Physiol.*, vol. 256, no. 4 Pt 1, pp. G661-666, Apr. 1989.
- [73] X.-J. Teng, R. Liu, X.-J. Li, J.-F. He, and S.-S. Xiao, "Increased expression of endothelin-1 and endothelin receptor A in reflux esophagitis and Barrett's esophagus," *Dis. Esophagus Off. J. Int. Soc. Dis. Esophagus*, vol. 26, no. 7, pp. 668–673, Oct. 2013.
- [74] H. Inagaki, A. E. Bishop, C. Escrig, J. Wharton, T. G. Allen-Mersh, and J. M. Polak, "Localization of endothelinlike immunoreactivity and endothelin binding sites in human colon," *Gastroenterology*, vol. 101, no. 1, pp. 47–54, Jul. 1991.
- [75] M. Kuhn *et al.*, "Endothelin-1 potently stimulates chloride secretion and inhibits Na(+)-glucose absorption in human intestine in vitro.," *J. Physiol.*, vol. 499, no. Pt 2, pp. 391–402, Mar. 1997.
- [76] C. Escrig *et al.*, "Localisation of endothelin like immunoreactivity in adult and developing human gut," *Gut*, vol. 33, no. 2, pp. 212–217, Feb. 1992.
- [77] E. G. Puffenberger *et al.*, "A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease," *Cell*, vol. 79, no. 7, pp. 1257–1266, Dec. 1994.
- [78] P. Korth, R. M. Bohle, P. Corvol, and F. Pinet, "Cellular distribution of endothelin-converting enzyme-1 in human tissues," *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, vol. 47, no. 4, pp. 447–462, Apr. 1999.
- [79] G. Egidy, L. Juillerat-Jeanneret, P. Korth, F. T. Bosman, and F. Pinet, "The endothelin system in normal human colon," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 279, no. 1, pp. G211-222, Jul. 2000.
- [80] S. J. Alrawi *et al.*, "Aberrant crypt foci," *Anticancer Res.*, vol. 26, no. 1A, pp. 107–119, Feb. 2006.

- [81] R. P. Bird, "Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings," *Cancer Lett.*, vol. 37, no. 2, pp. 147–151, Oct. 1987.
- [82] B. Tudek, R. P. Bird, and W. R. Bruce, "Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods," *Cancer Res.*, vol. 49, no. 5, pp. 1236–1240, Mar. 1989.
- [83] D. P. Hurlstone, T. Fujii, and A. J. Lobo, "Early detection of colorectal cancer using high-magnification chromoscopic colonoscopy," *Br. J. Surg.*, vol. 89, no. 3, pp. 272–282, Mar. 2002.
- [84] K. Otori, K. Sugiyama, T. Hasebe, S. Fukushima, and H. Esumi, "Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation," *Cancer Res.*, vol. 55, no. 21, pp. 4743–4746, Nov. 1995.
- [85] T. P. Pretlow *et al.*, "Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa," *Cancer Res.*, vol. 51, no. 5, pp. 1564–1567, Mar. 1991.
- [86] T. P. Pretlow, M. A. O'Riordan, T. G. Pretlow, and T. A. Stellato, "Aberrant crypts in human colonic mucosa: putative preneoplastic lesions," *J. Cell. Biochem. Suppl.*, vol. 16G, pp. 55–62, 1992.
- [87] T. Yokota *et al.*, "Detection of aberrant crypt foci by magnifying colonoscopy," *Gastrointest. Endosc.*, vol. 46, no. 1, pp. 61–65, Jul. 1997.
- [88] E. A. McLellan, A. Medline, and R. P. Bird, "Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions in rat colon," *Carcinogenesis*, vol. 12, no. 11, pp. 2093–2098, Nov. 1991.
- [89] S. Kudo, S. Tamura, T. Nakajima, H. Yamano, H. Kusaka, and H. Watanabe, "Diagnosis of colorectal tumorous lesions by magnifying endoscopy," *Gastrointest. Endosc.*, vol. 44, no. 1, pp. 8–14, Jul. 1996.
- [90] W. M. Grady, "Genomic instability and colon cancer," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 23, no. 1–2, pp. 11–27, Jun. 2004.
- [91] S. J. Spechler, "Disputing dysplasia," *Gastroenterology*, vol. 120, no. 7, pp. 1864–1868, Jun. 2001.
- [92] R. H. Riddell *et al.*, "Dysplasia in inflammatory bowel disease: Standardized classification with provisional clinical applications," *Hum. Pathol.*, vol. 14, no. 11, pp. 931–968, Nov. 1983.
- [93] F. Fogt, R. L. Zimmerman, H. M. Ross, T. Daly, and R. E. Gausas, "Identification of lymphatic vessels in malignant, adenomatous and normal colonic mucosa using the novel immunostain D2-40," *Oncol. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 47–50, Jan. 2004.
- [94] J. D. Waye, D. K. Rex, and C. B. Williams, *Colonoscopy: principles and practice*, Segunda edición. Blackwell Publishing Ltd., 2009.
- [95] American Cancer society, "Colorectal Cancer Stages," *www.cancer.org*, 2016. [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>.
- [96] E. Friedman, C. Urmacher, and S. Winawer, "A Model for Human Colon Carcinoma Evolution Based on the Differential Response of Cultured Preneoplastic, Premalignant, and Malignant Cells to 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate," *PubMed J.*, vol. 44, no. 4, pp. 1568–1578, 1984.

- [97] D. E. Corpet and F. Pierre, "Point: From Animal Models to Prevention of Colon Cancer. Systematic Review of Chemoprevention in Min Mice and Choice of the Model System," *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.*, vol. 12, no. 5, pp. 391–400, May 2003.
- [98] R. Fodde and R. Smits, "Disease model: familial adenomatous polyposis," *Trends Mol. Med.*, vol. 7, no. 8, pp. 369–373, Aug. 2001.
- [99] J. Heyer, K. Yang, M. Lipkin, W. Edelmann, and R. Kucherlapati, "Mouse models for colorectal cancer," *Oncogene*, vol. 18, p. 5325 ± 5333, 1999.
- [100] M. Oshima *et al.*, "Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2)," *Cell*, vol. 87, no. 5, pp. 803–809, Nov. 1996.
- [101] H. Seno *et al.*, "Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 2, pp. 506–511, Jan. 2002.
- [102] K. Takaku *et al.*, "Suppression of intestinal polyposis in Apc(delta 716) knockout mice by an additional mutation in the cytosolic phospholipase A(2) gene," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 44, pp. 34013–34016, Nov. 2000.
- [103] A. Garofalo, R. G. Chirivi, E. Scanziani, J. G. Mayo, A. Vecchi, and R. Giavazzi, "Comparative study on the metastatic behavior of human tumors in nude, beige/nude/xid and severe combined immunodeficient mice," *Invasion Metastasis*, vol. 13, no. 2, pp. 82–91, 1993.
- [104] R. M. Hoffman, "Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic," *Invest. New Drugs*, vol. 17, no. 4, pp. 343–359, 1999.
- [105] R. Hasegawa *et al.*, "Dose-dependence of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP) carcinogenicity in rats," *Carcinogenesis*, vol. 14, no. 12, pp. 2553–2557, Dec. 1993.
- [106] B. S. Reddy and A. Rivenson, "Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen," *Cancer Res.*, vol. 53, no. 17, pp. 3914–3918, Sep. 1993.
- [107] D. W. Rosenberg, C. Giardina, and T. Tanaka, "Mouse models for the study of colon carcinogenesis," *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 2, pp. 183–196, Feb. 2009.
- [108] B. S. Reddy and T. Ohmori, "Effect of intestinal microflora and dietary fat on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced colon carcinogenesis in F344 rats," *Cancer Res.*, vol. 41, no. 4, pp. 1363–1367, Apr. 1981.
- [109] A. L. Walpole, M. H. C. Williams, and D. C. Roberts, "The carcinogenic action of 4-aminodiphenyl and 3:2'-dimethyl-4-amino-diphenyl," *Br. J. Ind. Med.*, vol. 9, no. 4, pp. 255–263, Oct. 1952.
- [110] T. Narisawa, N. E. Magadia, J. H. Weisburger, and E. L. Wynder, "Promoting Effect of Bile Acids on Colon Carcinogenesis After Intrarectal Instillation of N-Methyl-N' nitro-N-nitrosoguanidine in Rats," *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 53, no. 4, pp. 1093–1097, Oct. 1974.
- [111] E. E. Deschner and F. C. Long, "Colonic neoplasms in mice produced with six injections of 1,2-dimethylhydrazine," *Oncology*, vol. 34, no. 6, pp. 255–257, 1977.
- [112] C. Neufert, C. Becker, and M. F. Neurath, "An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression," *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 8, pp. 1998–2004, 2007.

- [113] R. Suzuki, H. Kohno, S. Sugie, H. Nakagama, and T. Tanaka, "Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice," *Carcinogenesis*, vol. 27, no. 1, pp. 162–169, Jan. 2006.
- [114] T. Tanaka, "Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies," *J. Carcinog.*, vol. 8, p. 5, 2009.
- [115] M. M. Hoosein *et al.*, "Altered endothelin receptor subtypes in colorectal cancer," *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 19, no. 9, pp. 775–782, 2007.
- [116] A. Bagnato, F. Spinella, and L. Rosanò, "The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 86, no. 8, pp. 473–484, Aug. 2008.
- [117] N. Said, S. Smith, M. Sanchez-Carbayo, and D. Theodorescu, "Tumor endothelin-1 enhances metastatic colonization of the lung in mouse xenograft models of bladder cancer," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 1, pp. 132–147, Jan. 2011.
- [118] E. Eltze *et al.*, "Expression of the Endothelin Axis in Noninvasive and Superficially Invasive Bladder Cancer: Relation to Clinicopathologic and Molecular Prognostic Parameters," *Eur. Urol.*, vol. 56, no. 5, pp. 837–847, Nov. 2009.
- [119] G. Egidy *et al.*, "The endothelin system in human glioblastoma," *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 80, no. 11, pp. 1681–1689, Nov. 2000.
- [120] E. Anguelova *et al.*, "Functional endothelin ETB receptors are selectively expressed in human oligodendrogliomas," *Mol. Brain Res.*, vol. 137, no. 1–2, pp. 77–88, Jun. 2005.
- [121] P. Wülfing *et al.*, "Expression of endothelin-1, endothelin-A, and endothelin-B receptor in human breast cancer and correlation with long-term follow-up," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 9, no. 11, pp. 4125–4131, Sep. 2003.
- [122] P. Wülfing *et al.*, "Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 10, no. 7, pp. 2393–2400, Apr. 2004.
- [123] D. J. Sun *et al.*, "Endothelin-3 growth factor levels decreased in cervical cancer compared with normal cervical epithelial cells," *Hum. Pathol.*, vol. 38, no. 7, pp. 1047–1056, Jul. 2007.
- [124] P. Liakou *et al.*, "Expression patterns of endothelin-1 and its receptors in colorectal cancer," *J. Surg. Oncol.*, vol. 105, no. 7, pp. 643–649, Jun. 2012.
- [125] L.-S. Hsu, H.-C. Lee, G.-Y. Chau, P.-H. Yin, C.-W. Chi, and W. Y. Lui, "Aberrant methylation of EDNRB and p16 genes in hepatocellular carcinoma (HCC) in Taiwan," *Oncol. Rep.*, vol. 15, no. 2, pp. 507–511, Feb. 2006.
- [126] R. Fukui *et al.*, "Inhibitory effect of endothelin A receptor blockade on tumor growth and liver metastasis of a human gastric cancer cell line," *Gastric Cancer Off. J. Int. Gastric Cancer Assoc. Jpn. Gastric Cancer Assoc.*, vol. 10, no. 2, pp. 123–128, 2007.
- [127] K. Tao *et al.*, "Quantitative analysis of promoter methylation of the EDNRB gene in gastric cancer," *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.*, vol. 29, no. 1, pp. 107–112, Mar. 2012.
- [128] S. Ishimoto *et al.*, "Role of endothelin receptor signalling in squamous cell carcinoma," *Int. J. Oncol.*, vol. 40, no. 4, pp. 1011–1019, Nov. 2011.
- [129] Y.-F. Wen *et al.*, "Polymorphisms in the endothelin-1 and endothelin a receptor genes and survival in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 17, no. 8, pp. 2451–2458, Apr. 2011.

- [130] L. Boldrini *et al.*, “Expression of endothelin-1 is related to poor prognosis in non-small cell lung carcinoma,” *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990, vol. 41, no. 18, pp. 2828–2835, Dec. 2005.
- [131] S. Blouquit-Laye, A. Regnier, A. Beauchet, U. Zimmermann, P. Devillier, and T. Chinet, “Expression of endothelin receptor subtypes in bronchial tumors,” *Oncol. Rep.*, vol. 23, no. 2, pp. 457–463, Feb. 2010.
- [132] M. Bittner *et al.*, “Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling,” *Nature*, vol. 406, no. 6795, pp. 536–540, Aug. 2000.
- [133] A. Demunter, C. De Wolf-Peeters, H. Degreef, M. Stas, and J. J. van den Oord, “Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma,” *Virchows Arch. Int. J. Pathol.*, vol. 438, no. 5, pp. 485–491, May 2001.
- [134] S. L. Smith, B. E. Damato, A. G. M. Scholes, J. Nunn, J. K. Field, and J. Heighway, “Decreased endothelin receptor B expression in large primary uveal melanomas is associated with early clinical metastasis and short survival,” *Br. J. Cancer*, vol. 87, no. 11, pp. 1308–1313, Nov. 2002.
- [135] A. Bagnato *et al.*, “Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth,” *Cancer Res.*, vol. 59, no. 3, pp. 720–727, Feb. 1999.
- [136] J. Helleman, M. Smid, M. P. H. M. Jansen, M. E. L. van der Burg, and E. M. J. J. Berns, “Pathway analysis of gene lists associated with platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer: the big picture,” *Gynecol. Oncol.*, vol. 117, no. 2, pp. 170–176, May 2010.
- [137] L. Rosanò *et al.*, “Endothelin-1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in human ovarian cancer cells,” *Cancer Res.*, vol. 65, no. 24, pp. 11649–11657, Dec. 2005.
- [138] L. Rosanò, F. Spinella, and A. Bagnato, “The importance of endothelin axis in initiation, progression, and therapy of ovarian cancer,” *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 299, no. 2, pp. R395-404, Aug. 2010.
- [139] J. B. Nelson *et al.*, “Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate,” *Nat. Med.*, vol. 1, no. 9, pp. 944–949, Sep. 1995.
- [140] G. Godara *et al.*, “Distinct patterns of endothelin axis expression in primary prostate cancer,” *Urology*, vol. 70, no. 1, pp. 209–215, Jul. 2007.
- [141] J. B. Nelson *et al.*, “Suppression of prostate cancer induced bone remodeling by the endothelin receptor A antagonist atrasentan,” *J. Urol.*, vol. 169, no. 3, pp. 1143–1149, Mar. 2003.
- [142] E. Herrmann *et al.*, “Expression of the Endothelin-axis in the different histologic subtypes of renal cell carcinoma: a tissue microarray analysis,” *Oncol. Rep.*, vol. 17, no. 2, pp. 275–280, Feb. 2007.
- [143] M. L. Douglas, M. M. Richardson, and D. L. Nicol, “Endothelin axis expression is markedly different in the two main subtypes of renal cell carcinoma,” *Cancer*, vol. 100, no. 10, pp. 2118–2124, May 2004.
- [144] D. Wuttig *et al.*, “CD31, EDNRB and TSPAN7 are promising prognostic markers in clear-cell renal cell carcinoma revealed by genome-wide expression analyses of primary tumors and metastases,” *Int. J. Cancer*, vol. 131, no. 5, pp. E693-704, Sep. 2012.
- [145] M. Yao *et al.*, “A three-gene expression signature model to predict clinical outcome of clear cell renal carcinoma,” *Int. J. Cancer*, vol. 123, no. 5, pp. 1126–1132, Sep. 2008.

- [146] E. Eltze, M. Bertolin, E. Korsching, P. Wülfing, T. Maggino, and R. Lellé, "Expression and prognostic relevance of endothelin-B receptor in vulvar cancer," *Oncol. Rep.*, vol. 18, no. 2, pp. 305–311, Aug. 2007.
- [147] J. B. Nelson *et al.*, "Phase 3, randomized, placebo-controlled study of zibotentan (ZD4054) in patients with castration-resistant prostate cancer metastatic to bone," *Cancer*, vol. 118, no. 22, pp. 5709–5718, Nov. 2012.
- [148] N. Ambalavanan, P. Li, A. Bulger, J. Murphy-Ullrich, S. Oparil, and Y.-F. Chen, "Endothelin-1 Mediates Hypoxia-Induced Increases in Vascular Collagen in the Newborn Mouse Lung," *Pediatr. Res.*, vol. 61, no. 5 Pt 1, pp. 559–564, May 2007.
- [149] A. Bagnato and L. Rosanò, "The endothelin axis in cancer," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 40, no. 8, pp. 1443–1451, 2008.
- [150] A. Ergul, "Endothelin-1 and endothelin receptor antagonists as potential cardiovascular therapeutic agents," *Pharmacotherapy*, vol. 22, no. 1, pp. 54–65, Jan. 2002.
- [151] I. Komuro, H. Kurihara, T. Sugiyama, F. Takaku, and Y. Yazaki, "Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells," *FEBS Lett.*, vol. 238, no. 2, pp. 249–252, Oct. 1988.
- [152] M. Kusuhara *et al.*, "Endothelin potentiates growth factor-stimulated DNA synthesis in Swiss 3T3 cells," *Jpn. J. Cancer Res. Gann*, vol. 80, no. 4, pp. 302–305, Apr. 1989.
- [153] T. Nakaki, M. Nakayama, S. Yamamoto, and R. Kato, "Endothelin-mediated stimulation of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 158, no. 3, pp. 880–883, Feb. 1989.
- [154] M. J. Grimshaw, S. Naylor, and F. R. Balkwill, "Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 1, no. 14, pp. 1273–1281, Dec. 2002.
- [155] K. Tanese, M. Fukuma, A. Ishiko, and M. Sakamoto, "Endothelin-2 is upregulated in basal cell carcinoma under control of Hedgehog signaling pathway," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 391, no. 1, pp. 486–491, Jan. 2010.
- [156] M. J. Grimshaw, T. Hagemann, A. Ayhan, C. E. Gillett, C. Binder, and F. R. Balkwill, "A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 7, pp. 2461–2468, Apr. 2004.
- [157] M. J. Grimshaw, J. L. Wilson, and F. R. Balkwill, "Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors," *Eur. J. Immunol.*, vol. 32, no. 9, pp. 2393–2400, Sep. 2002.
- [158] R. Wang *et al.*, "Epigenetic inactivation of endothelin-2 and endothelin-3 in colon cancer," *Int. J. Cancer*, vol. 132, no. 5, pp. 1004–1012, Mar. 2013.
- [159] H. Ali, M. Loizidou, M. Dashwood, F. Savage, C. Sheard, and I. Taylor, "Stimulation of colorectal cancer cell line growth by ET-1 and its inhibition by ET(A) antagonists," *Gut*, vol. 47, no. 5, pp. 685–688, Nov. 2000.
- [160] Asham, E *et al.*, "Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ETA receptor antagonism," *British Journal of Cancer*, vol. 85, pp. 1759–1763, 2001.
- [161] L. Peduto Eberl, R. Bovey, and L. Juillerat-Jeanneret, "Endothelin-receptor antagonists are proapoptotic and antiproliferative in human colon cancer cells," *Br. J. Cancer*, vol. 88, no. 5, pp. 788–795, Mar. 2003.

- [162] K. Grant, J. Knowles, K. Dawas, G. Burnstock, I. Taylor, and M. Loizidou, "Mechanisms of endothelin 1-stimulated proliferation in colorectal cancer cell lines," *Br. J. Surg.*, vol. 94, no. 1, pp. 106–112, Jan. 2007.
- [163] A. J. de Bold, "Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart," *Science*, vol. 230, no. 4727, pp. 767–770, Nov. 1985.
- [164] T. Sudoh, K. Kangawa, N. Minamino, and H. Matsuo, "A new natriuretic peptide in porcine brain," *Nature*, vol. 332, no. 6159, pp. 78–81, Mar. 1988.
- [165] T. Sudoh, N. Minamino, K. Kangawa, and H. Matsuo, "C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 168, no. 2, pp. 863–870, Apr. 1990.
- [166] K. J. Koller and D. V. Goeddel, "Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors," *Circulation*, vol. 86, no. 4, pp. 1081–1088, Oct. 1992.
- [167] K. J. Koller *et al.*, "Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP)," *Science*, vol. 252, no. 5002, pp. 120–123, Apr. 1991.
- [168] M. Kuhn, "Molecular physiology of natriuretic peptide signalling," *Basic Res. Cardiol.*, vol. 99, no. 2, pp. 76–82, Mar. 2004.
- [169] D. R. Martin, J. B. Pevahouse, D. J. Trigg, D. L. Vesely, and J. E. Buerkert, "Three peptides from the ANF prohormone NH(2)-terminus are natriuretic and/or kaliuretic," *Am. J. Physiol.*, vol. 258, no. 5 Pt 2, pp. F1401–1408, May 1990.
- [170] D. L. Vesely, J. S. Norris, J. M. Walters, R. R. Jespersen, and D. A. Baeyens, "Atrial natriuretic prohormone peptides 1-30, 31-67, and 79-98 vasodilate the aorta," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 148, no. 3, pp. 1540–1548, Nov. 1987.
- [171] D. L. Vesely *et al.*, "Negative feedback of atrial natriuretic peptides," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 78, no. 5, pp. 1128–1134, May 1994.
- [172] D. L. Vesely *et al.*, "Three peptides from the atrial natriuretic factor prohormone amino terminus lower blood pressure and produce diuresis, natriuresis, and/or kaliuresis in humans," *Circulation*, vol. 90, no. 3, pp. 1129–1140, Sep. 1994.
- [173] C. J. Charles, E. A. Espiner, and A. M. Richards, "Cardiovascular actions of ANF: contributions of renal, neurohumoral, and hemodynamic factors in sheep," *Am. J. Physiol.*, vol. 264, no. 3 Pt 2, pp. R533–538, Mar. 1993.
- [174] A. J. Stingo, A. L. Clavell, L. L. Aarhus, and J. C. Burnett, "Cardiovascular and renal actions of C-type natriuretic peptide," *Am. J. Physiol.*, vol. 262, no. 1 Pt 2, pp. H308–312, Jan. 1992.
- [175] R. G. Appel, "Growth-regulatory properties of atrial natriuretic factor," *Am. J. Physiol.*, vol. 262, no. 6 Pt 2, pp. F911–918, Jun. 1992.
- [176] V. H. Casco, J. P. Veinot, M. L. K. de Bold, R. G. Masters, M. M. Stevenson, and A. J. de Bold, "Natriuretic Peptide System Gene Expression in Human Coronary Arteries," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 50, no. 6, pp. 799–809, Jun. 2002.
- [177] H. Itoh, R. E. Pratt, and V. J. Dzau, "Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells," *J. Clin. Invest.*, vol. 86, no. 5, pp. 1690–1697, Nov. 1990.
- [178] J. W. Knowles *et al.*, "Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 107, no. 8, pp. 975–984, Apr. 2001.
- [179] E. R. Levin, D. G. Gardner, and W. K. Samson, "Natriuretic Peptides," *N. Engl. J. Med.*, vol. 339, no. 5, pp. 321–328, Jul. 1998.

- [180] N. Tamura *et al.*, “Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 8, pp. 4239–4244, Apr. 2000.
- [181] B. C. Kone, “Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 429–441, Aug. 2001.
- [182] A. M. Vollmar, A. Friedrich, F. Sinowatz, and R. Schulz, “Presence of atrial natriuretic peptide-like material in guinea pig intestine,” *Peptides*, vol. 9, no. 5, pp. 965–971, Oct. 1988.
- [183] O. Vuolteenaho *et al.*, “Atrial natriuretic peptide (ANP) in rat gastrointestinal tract,” *FEBS Lett.*, vol. 233, no. 1, pp. 79–82, Jun. 1988.
- [184] C. Bianchi, J. Gutkowska, G. Thibault, R. Garcia, J. Genest, and M. Cantin, “Radioautographic localization of 125I-atrial natriuretic factor (ANF) in rat tissues,” *Histochemistry*, vol. 82, no. 5, pp. 441–452, 1985.
- [185] M. R. Crane, P. O’Hanley, and S. A. Waldman, “Rat intestinal cell atrial natriuretic peptide receptor coupled to guanylate cyclase,” *Gastroenterology*, vol. 99, no. 1, pp. 125–131, Jul. 1990.
- [186] L. V. González Bosc, M. P. Majowicz, and N. A. Vidal, “Effects of atrial natriuretic peptide in the gut,” *Peptides*, vol. 21, no. 6, pp. 875–887, Jun. 2000.
- [187] W. R. Gower *et al.*, “Atrial natriuretic peptide gene expression in the rat gastrointestinal tract,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 202, no. 1, pp. 562–570, Jul. 1994.
- [188] J. H. Kim, G. J. Jeon, S. Z. Kim, K. W. Cho, and S. H. Kim, “C-type natriuretic peptide system in rabbit colon,” *Peptides*, vol. 22, no. 12, pp. 2061–2068, Dec. 2001.
- [189] C. Sogawa *et al.*, “C-Type Natriuretic Peptide Specifically Acts on the Pylorus and Large Intestine in Mouse Gastrointestinal Tract,” *Am. J. Pathol.*, vol. 182, no. 1, pp. 172–179, Jan. 2013.
- [190] W. R. Gower, B. A. Vesely, A. A. Alli, and D. L. Vesely, “Four peptides decrease human colon adenocarcinoma cell number and DNA synthesis via cyclic GMP,” *Int. J. Gastrointest. Cancer*, vol. 36, no. 2, pp. 77–87, 2005.
- [191] B. A. Vesely, Q. McAfee, W. R. Gower, and D. L. Vesely, “Four peptides decrease the number of human pancreatic adenocarcinoma cells,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 33, no. 11, pp. 998–1005, Nov. 2003.
- [192] B. A. Vesely *et al.*, “Five cardiac hormones decrease the number of human small-cell lung cancer cells,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 35, no. 6, pp. 388–398, Jun. 2005.
- [193] B. A. Vesely, A. A. Alli, S. J. Song, W. R. Gower, J. Sanchez-Ramos, and D. L. Vesely, “Four peptide hormones’ specific decrease (up to 97%) of human prostate carcinoma cells,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 35, no. 11, pp. 700–710, Nov. 2005.
- [194] B. A. Vesely, E. J. Eichelbaum, A. A. Alli, Y. Sun, W. R. Gower, and D. L. Vesely, “Urodilatin and four cardiac hormones decrease human renal carcinoma cell numbers,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 36, no. 11, pp. 810–819, Nov. 2006.
- [195] B. A. Vesely, S. R. Fitz, W. R. Gower, and D. L. Vesely, “Vessel dilator: most potent of the atrial natriuretic peptides in decreasing the number and DNA synthesis of human squamous lung cancer cells,” *Cancer Lett.*, vol. 233, no. 2, pp. 226–231, Feb. 2006.
- [196] D. L. Vesely, “Cardiac and renal hormones: anticancer effects in vitro and in vivo,” *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.*, vol. 57, no. 1, pp. 22–28, Jan. 2009.
- [197] *GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS*, Octava edicion. Washington: the national academies press, 2011.

- [198] M. De Robertis *et al.*, “The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies,” *J. Carcinog.*, vol. 10, Mar. 2011.
- [199] Diaz-Zamboni, Javier, “Software para usuarios de Microscopia de Desconvolución Digital (S.U.M.D.D.),” Universidad Nacional de Entre Ríos, Facultad de Ingeniería, 2004.
- [200] W. Lo *et al.*, “Fast Fourier transform-based analysis of second-harmonic generation image in keratoconic cornea,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 53, no. 7, pp. 3501–3507, Jun. 2012.
- [201] A. B. Dydensborg, E. Herring, J. Auclair, E. Tremblay, and J.-F. Beaulieu, “Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon,” *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 290, no. 5, pp. G1067-1074, May 2006.
- [202] E. A. Kheirleiseid, K. H. Chang, J. Newell, M. J. Kerin, and N. Miller, “Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer,” *BMC Mol. Biol.*, vol. 11, p. 12, Feb. 2010.
- [203] W. C. Aird, “Endothelial cell heterogeneity,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, no. 1, p. a006429, Jan. 2012.
- [204] J. Browning, “Octopus microvasculature: permeability to ferritin and carbon,” *Tissue Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 371–383, 1979.
- [205] P. C. Moller and C. W. Philpott, “The circulatory system of *Amphioxus* (*Branchiostoma floridae*). I. Morphology of the major vessels of the pharyngeal area,” *J. Morphol.*, vol. 139, no. 4, pp. 389–406, Apr. 1973.
- [206] P. C. Moller and C. W. Philpott, “The circulatory system of *amphioxus* (*Branchiostoma floridae*). II. Uptake of exogenous proteins by endothelial cells,” *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria 1948*, vol. 143, no. 1, pp. 135–141, 1973.
- [207] T. Shigei, H. Tsuru, N. Ishikawa, and K. Yoshioka, “Absence of endothelium in invertebrate blood vessels: significance of endothelium and sympathetic nerve/medial smooth muscle in the vertebrate vascular system,” *Jpn. J. Pharmacol.*, vol. 87, no. 4, pp. 253–260, Dec. 2001.
- [208] E. E. Ruppert and K. J. Carle, “Morphology of metazoan circulatory systems,” *Zoomorphology*, vol. 103, no. 3, pp. 193–208, Nov. 1983.
- [209] R. Muñoz-Chápuli, R. Carmona, J. A. Guadix, D. Macías, and J. M. Pérez-Pomares, “The origin of the endothelial cells: an evo-devo approach for the invertebrate/vertebrate transition of the circulatory system,” *Evol. Dev.*, vol. 7, no. 4, pp. 351–358, Aug. 2005.
- [210] E. Lammert, O. Cleaver, and D. Melton, “Role of endothelial cells in early pancreas and liver development,” *Mech. Dev.*, vol. 120, no. 1, pp. 59–64, Jan. 2003.
- [211] B. Strilić, T. Kučera, and E. Lammert, “Formation of cardiovascular tubes in invertebrates and vertebrates,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 67, no. 19, pp. 3209–3218, Oct. 2010.
- [212] J. Pascual-Anaya *et al.*, “The evolutionary origins of chordate hematopoiesis and vertebrate endothelia,” *Dev. Biol.*, vol. 375, no. 2, pp. 182–192, Mar. 2013.
- [213] K. A. Hyndman and D. H. Evans, “Endothelin and endothelin converting enzyme-1 in the fish gill: evolutionary and physiological perspectives,” *J. Exp. Biol.*, vol. 210, no. 24, pp. 4286–4297, Dec. 2007.

- [214] J.-R. Martínez-Morales, T. Henrich, M. Ramialison, J. Wittbrodt, and J.-R. Martínez-Morales, "New genes in the evolution of the neural crest differentiation program," *Genome Biol.*, vol. 8, no. 3, p. R36, 2007.
- [215] N. D. Bland, J. W. Pinney, J. E. Thomas, A. J. Turner, and R. E. Isaac, "Bioinformatic analysis of the neprilysin (M13) family of peptidases reveals complex evolutionary and functional relationships," *BMC Evol. Biol.*, vol. 8, p. 16, Jan. 2008.
- [216] J. Zhang, A. Leontovich, and M. P. Sarras, "Molecular and functional evidence for early divergence of an endothelin-like system during metazoan evolution: analysis of the Cnidarian, hydra," *Dev. Camb. Engl.*, vol. 128, no. 9, pp. 1607–1615, May 2001.
- [217] Y. Zheng, D. Xu, and X. Gu, "Functional divergence after gene duplication and sequence-structure relationship: a case study of G-protein alpha subunits," *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, vol. 308, no. 1, pp. 85–96, Jan. 2007.
- [218] I. Braasch, J.-N. Volff, and M. Scharl, "The endothelin system: evolution of vertebrate-specific ligand-receptor interactions by three rounds of genome duplication," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 26, no. 4, pp. 783–799, Apr. 2009.
- [219] Z. Zhang *et al.*, "Protein sequence similarity searches using patterns as seeds.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 26, no. 17, pp. 3986–3990, Sep. 1998.
- [220] K. Hosoda *et al.*, "Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA," *FEBS Lett.*, vol. 287, no. 1–2, pp. 23–26, Aug. 1991.
- [221] M. Baltazares Lipp, H. Rodríguez Crespo, J. Ortega Martínez, A. Sotres-Vega, B. Lipp, and M. Enrique, "Sistema endotelina," *Rev. Inst. Nac. Enfermedades Respir.*, vol. 18, no. 4, pp. 308–320, Dec. 2005.
- [222] P. J. Milla, "Advances in understanding colonic function," *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 48 Suppl 2, pp. S43-45, Apr. 2009.
- [223] H. Druckrey, R. Preussmann, F. Matzkies, and S. Ivankovic, "Selective Production of Intestinal Cancer in Rats by 1,2-Dimethylhydrazine," *PubMed J.*, vol. 54, no. 11, pp. 285–286, 1967.
- [224] C. Koseki, M. Imai, Y. Hirata, M. Yanagisawa, and T. Masaki, "Autoradiographic distribution in rat tissues of binding sites for endothelin: a neuropeptide?," *Am. J. Physiol.*, vol. 256, no. 4 Pt 2, pp. R858-866, Apr. 1989.
- [225] M. Yoshimura, Y. Yamashita, S. Kan, M. Niwa, and K. Taniyama, "Localization of endothelin ETB receptors on the myenteric plexus of guinea-pig ileum and the receptor-mediated release of acetylcholine.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 118, no. 5, pp. 1171–1176, Jul. 1996.
- [226] S. Takizawa, T. Uchide, T. Kozakai, J. Adur, J. Quan, and K. Saida, "Immunolocalization of Endothelin-B Receptor in Mouse Intesti...: Journal of Cardiovascular Pharmacology," *LWW*, 2004.
- [227] G. Bkaily *et al.*, "Nuclear membrane receptors for ET-1 in cardiovascular function," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 300, no. 2, pp. R251-263, Feb. 2011.
- [228] B. Hocher, C. Rubens, J. Hensen, P. Gross, and C. Bauer, "Intracellular distribution of endothelin-1 receptors in rat liver cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 184, no. 1, pp. 498–503, Apr. 1992.
- [229] G. Bkaily *et al.*, "Angiotensin II AT1 receptor internalization, translocation and de novo synthesis modulate cytosolic and nuclear calcium in human vascular smooth muscle cells," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 81, no. 3, pp. 274–287, Mar. 2003.

- [230] G. Bkaily, L. Avedanian, and D. Jacques, "Nuclear membrane receptors and channels as targets for drug development in cardiovascular diseases," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 87, no. 2, pp. 108–119, Feb. 2009.
- [231] G. W. Booz, K. M. Conrad, A. L. Hess, H. A. Singer, and K. M. Baker, "Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei," *Endocrinology*, vol. 130, no. 6, pp. 3641–3649, Jun. 1992.
- [232] G. Bkaily *et al.*, "Bradykinin activates R-, T-, and L-type Ca²⁺ channels and induces a sustained increase of nuclear Ca²⁺ in aortic vascular smooth muscle cells," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 75, no. 6, pp. 652–660, Jun. 1997.
- [233] M. Savard *et al.*, "Expression of endogenous nuclear bradykinin B2 receptors mediating signaling in immediate early gene activation," *J. Cell. Physiol.*, vol. 216, no. 1, pp. 234–244, Jul. 2008.
- [234] G. Bkaily *et al.*, "The use of confocal microscopy in the investigation of cell structure and function in the heart, vascular endothelium and smooth muscle cells," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 172, no. 1–2, pp. 171–194, Jul. 1997.
- [235] M. Bhattacharya *et al.*, "Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 22, pp. 15719–15724, May 1999.
- [236] F. Gobeil *et al.*, "Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP(3) receptors," *Circ. Res.*, vol. 90, no. 6, pp. 682–689, Apr. 2002.
- [237] D. Jacques *et al.*, "Presence of neuropeptide Y and the Y1 receptor in the plasma membrane and nuclear envelope of human endocardial endothelial cells: modulation of intracellular calcium," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 81, no. 3, pp. 288–300, Mar. 2003.
- [238] D. Jacques, S. Sader, C. Perreault, and D. Abdel-Samad, "NPY and NPY receptors: presence, distribution and roles in the regulation of the endocardial endothelium and cardiac function," in *NPY Family of Peptides in Neurobiology, Cardiovascular and Metabolic Disorders: from Genes to Therapeutics*, Z. Zukowska and G. Z. Feuerstein, Eds. Birkhäuser Basel, 2006, pp. 77–87.
- [239] D. Jacques, S. Sader, C. Perreault, D. Abdel-Samad, F. Jules, and C. Provost, "NPY, ET-1, and Ang II nuclear receptors in human endocardial endothelial cells," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 84, no. 3–4, pp. 299–307, Apr. 2006.
- [240] C. De Miguel, J. S. Speed, M. Kasztan, E. Y. Gohar, and D. M. Pollock, "Endothelin-1 and the kidney: new perspectives and recent findings," *LWW*, vol. 25, no. 1, pp. 35–41, 2016.
- [241] M. Vanderheyden, J. Bartunek, and M. Goethals, "Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects," *Eur. J. Heart Fail.*, vol. 6, no. 3, pp. 261–268, Mar. 2004.
- [242] D. Louvard, M. Kedinger, and H. P. Hauri, "The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures," *Annu. Rev. Cell Biol.*, vol. 8, pp. 157–195, 1992.
- [243] N. C. Joyce, M. F. Haire, and G. E. Palade, "Morphologic and biochemical evidence for a contractile cell network within the rat intestinal mucosa," *Gastroenterology*, vol. 92, no. 1, pp. 68–81, Jan. 1987.
- [244] G. I. Kaye, N. Lane, and R. R. Pascal, "Colonic Pericryptal Fibroblast Sheath: Replication, Migration, and Cytodifferentiation of a Mesenchymal Cell System in Adult Tissue," *Gastroenterology*, vol. 54, no. 5, pp. 852–865, May 1968.

- [245] R. J. Naftalin and K. C. Pedley, "Regional crypt function in rat large intestine in relation to fluid absorption and growth of the pericryptal sheath," *J. Physiol.*, vol. 514, no. Pt 1, pp. 211–227, Jan. 1999.
- [246] T. Komuro and Y. Hashimoto, "Three-dimensional structure of the rat intestinal wall (mucosa and submucosa)," *Arch. Histol. Cytol.*, vol. 53, no. 1, pp. 1–21, Mar. 1990.
- [247] J. D. Valentich and D. W. Powell, "Intestinal subepithelial myofibroblasts and mucosal immunophysiology," *LWW*, vol. 10, no. 6, pp. 645–651, 1994.
- [248] H. Toyoda, K. Ina, H. Kitamura, T. Tsuda, and T. Shimada, "Organization of the lamina propria mucosae of rat intestinal mucosa, with special reference to the subepithelial connective tissue," *Acta Anat. (Basel)*, vol. 158, no. 3, pp. 172–184, 1997.
- [249] R. R. Pascal, G. I. Kaye, and N. Lane, "Colonic pericryptal fibroblast sheath: replication, migration, and cytodifferentiation of a mesenchymal cell system in adult tissue. I. Autoradiographic studies of normal rabbit colon," *Gastroenterology*, vol. 54, no. 5, pp. 835–851, May 1968.
- [250] D. W. Powell, R. C. Mifflin, J. D. Valentich, S. E. Crowe, J. I. Saada, and A. B. West, "Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts," *Am. J. Physiol.*, vol. 277, no. 2 Pt 1, pp. C183-201, Aug. 1999.
- [251] S. Furuya, K. Furuya, M. Sokabe, T. Hiroe, and T. Ozaki, "Characteristics of cultured subepithelial fibroblasts in the rat small intestine. II. Localization and functional analysis of endothelin receptors and cell-shape-independent gap junction permeability," *Cell Tissue Res.*, vol. 319, no. 1, pp. 103–119, Jan. 2005.
- [252] S. Furuya and K. Furuya, "Subepithelial fibroblasts in intestinal villi: roles in intercellular communication," *Int. Rev. Cytol.*, vol. 264, pp. 165–223, 2007.
- [253] J. D. Valentich, V. Popov, J. I. Saada, and D. W. Powell, "Phenotypic characterization of an intestinal subepithelial myofibroblast cell line," *Am. J. Physiol.*, vol. 272, no. 5 Pt 1, pp. C1513-1524, May 1997.
- [254] M. Clozel, G. A. Gray, V. Breu, B. M. Löffler, and R. Osterwalder, "The endothelin ETB receptor mediates both vasodilation and vasoconstriction in vivo," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 186, no. 2, pp. 867–873, Jul. 1992.
- [255] H. Okabe *et al.*, "Two endothelin receptors (ETA and ETB) expressed on circular smooth muscle cells of guinea pig cecum," *Gastroenterology*, vol. 108, no. 1, pp. 51–57, Jan. 1995.
- [256] K. C. Pedley and R. J. Naftalin, "Evidence from fluorescence microscopy and comparative studies that rat, ovine and bovine colonic crypts are absorptive," *J. Physiol.*, vol. 460, pp. 525–547, Jan. 1993.
- [257] D. W. Powell, "Dogma destroyed: colonic crypts absorb.," *J. Clin. Invest.*, vol. 96, no. 5, pp. 2102–2103, Nov. 1995.
- [258] D. Bleakman and R. J. Naftalin, "Hypertonic fluid absorption from rabbit descending colon in vitro," *Am. J. Physiol.*, vol. 258, no. 3 Pt 1, pp. G377-390, Mar. 1990.
- [259] D. W. Powell, "Water transport revisited," *J. Physiol.*, vol. 514, no. 1, pp. 1–1, Jan. 1999.
- [260] P. F. Curran and J. R. Macintosh, "A Model System for Biological Water Transport," *Nature*, vol. 193, no. 4813, pp. 347–348, Jan. 1962.
- [261] R. J. Naftalin, P. S. Zammit, and K. C. Pedley, "Regional differences in rat large intestinal crypt function in relation to dehydrating capacity in vivo," *J. Physiol.*, vol. 514, no. Pt 1, pp. 201–210, Jan. 1999.

- [262] W. Clauss, H. Schäfer, I. Horch, and H. Hörnicke, "Segmental differences in electrical properties and Na-transport of rabbit caecum, proximal and distal colon in vitro," *Pflüg. Arch.*, vol. 403, no. 3, pp. 278–282, Mar. 1985.
- [263] W. Clauss, K. H. Biehler, H. Schäfer, and N. K. Wills, "Ion transport and electrophysiology of the early proximal colon of rabbit," *Pflüg. Arch.*, vol. 408, no. 6, pp. 592–599, May 1987.
- [264] N. K. Wills, S. A. Lewis, and D. C. Eaton, "Active and passive properties of rabbit descending colon: A microelectrode and nystatin study," *J. Membr. Biol.*, vol. 45, no. 1–2, pp. 81–108, Mar. 1979.
- [265] A. H. Gitter, K. Bendfeldt, J. D. Schulzke, and M. Fromm, "Trans/paracellular, surface/crypt, and epithelial/subepithelial resistances of mammalian colonic epithelia," *Pflugers Arch.*, vol. 439, no. 4, pp. 477–482, Feb. 2000.
- [266] R. Warth and M. Bleich, "K⁺ channels and colonic function," in *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 140*, Springer Berlin Heidelberg, 2000, pp. 1–62.
- [267] T. Kiyohara, M. Okuno, T. Nakanishi, Y. Shinomura, and Y. Matsuzawa, "Effect of endothelin 1 on ion transport in isolated rat colon," *Gastroenterology*, vol. 104, no. 5, pp. 1328–1336, May 1993.
- [268] K. Laghmani, A. Sakamoto, M. Yanagisawa, P. A. Preisig, and R. J. Alpern, "A consensus sequence in the endothelin-B receptor second intracellular loop is required for NHE3 activation by endothelin-1," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 288, no. 4, pp. F732–739, Apr. 2005.
- [269] A. Sorokin and A. Staruschenko, "Inhibition of ENaC by endothelin-1," *Vitam. Horm.*, vol. 98, pp. 155–187, 2015.
- [270] H. Ehrenreich *et al.*, "Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages.," *J. Exp. Med.*, vol. 172, no. 6, pp. 1741–1748, Dec. 1990.
- [271] P. M. Bath, S. A. Mayston, and J. F. Martin, "Endothelin and PDGF do not stimulate peripheral blood monocyte chemotaxis, adhesion to endothelium, and superoxide production," *Exp. Cell Res.*, vol. 187, no. 2, pp. 339–342, Apr. 1990.
- [272] T. H. Achmad and G. S. Rao, "Chemotaxis of human blood monocytes toward endothelin-1 and the influence of calcium channel blockers," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 189, no. 2, pp. 994–1000, Dec. 1992.
- [273] P. Cui *et al.*, "A novel bioactive 31-amino acid endothelin-1 is a potent chemotactic peptide for human neutrophils and monocytes," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 70, no. 2, pp. 306–312, Aug. 2001.
- [274] A. J. Peacock, K. E. Dawes, A. Shock, A. J. Gray, J. T. Reeves, and G. J. Laurent, "Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 7, no. 5, pp. 492–499, Nov. 1992.
- [275] J. G. Elferink and B. M. de Koster, "The effect of endothelin-2 (ET-2) on migration and changes in cytosolic free calcium of neutrophils," *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, vol. 353, no. 2, pp. 130–135, Jan. 1996.
- [276] A. Krause, C. Liepke, M. Meyer, K. Adermann, W. G. Forssmann, and E. Maronde, "Human natriuretic peptides exhibit antimicrobial activity," *Eur. J. Med. Res.*, vol. 6, no. 5, pp. 215–218, May 2001.
- [277] Z. Oren and Y. Shai, "Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides," *Biopolymers*, vol. 47, no. 6, pp. 451–463, 1998.

- [278] Y. Shai, "Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1462, no. 1–2, pp. 55–70, Dec. 1999.
- [279] J. I. Kourie, "Characterization of a C-type natriuretic peptide (CNP-39)-formed cation-selective channel from platypus (*Ornithorhynchus anatinus*) venom," *J. Physiol.*, vol. 518, no. 2, pp. 359–369, Jul. 1999.
- [280] J. R. Fozard and M. L. Part, "No major role for atrial natriuretic peptide in the vasodilator response to endothelin-1 in the spontaneously hypertensive rat," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 180, no. 1, pp. 153–159, May 1990.
- [281] Y. Fukuda *et al.*, "Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 155, no. 1, pp. 167–172, Aug. 1988.
- [282] D. G. Gardner, E. D. Newman, K. K. Nakamura, and K. P. Nguyen, "Endothelin increases the synthesis and secretion of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiocytes," *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, vol. 261, no. 2, pp. E177–E182, Aug. 1991.
- [283] J. R. Hu, U. G. Berninger, and R. E. Lang, "Endothelin stimulates atrial natriuretic peptide (ANP) release from rat atria," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 158, no. 1–2, pp. 177–178, Dec. 1988.
- [284] K. Ota *et al.*, "Interaction of ANP with endothelin on cardiovascular, renal, and endocrine function," *Am. J. Physiol.*, vol. 262, no. 2 Pt 1, pp. E135–141, Feb. 1992.
- [285] M. Pitkänen, P. Mäntymaa, and H. Ruskoaho, "Staurosporine, a protein kinase C inhibitor, inhibits atrial natriuretic peptide secretion induced by sarafotoxin, endothelin and phorbol ester," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 195, no. 3, pp. 307–315, Apr. 1991.
- [286] J. P. Stasch, C. Hirth-Dietrich, S. Kazda, and D. Neuser, "Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo," *Life Sci.*, vol. 45, no. 10, pp. 869–875, 1989.
- [287] R. M. Hu, E. R. Levin, A. Pedram, and H. J. Frank, "Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. Mediation through the C receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 24, pp. 17384–17389, Aug. 1992.
- [288] O. Saijonmaa, A. Ristimäki, and F. Fyhrquist, "Atrial natriuretic peptide, nitroglycerine, and nitroprusside reduce basal and stimulated endothelin production from cultured endothelial cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 173, no. 2, pp. 514–520, Dec. 1990.
- [289] G. L. Laqueur, "Carcinogenic effects of cycad meal and cycasin, methylazoxymethanol glycoside, in rats and effects of cycasin in germfree rats," *Fed. Proc.*, vol. 23, pp. 1386–1388, Dec. 1964.
- [290] D. A. Delker, S. J. McKnight, and D. W. Rosenberg, "The Role of Alcohol Dehydrogenase in the Metabolism of the Colon Carcinogen Methylazoxymethanol," *Toxicol. Sci.*, vol. 45, no. 1, pp. 66–71, Sep. 1998.
- [291] O. S. Sohn, E. S. Fiala, S. P. Requeijo, J. H. Weisburger, and F. J. Gonzalez, "Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol," *Cancer Res.*, vol. 61, no. 23, pp. 8435–8440, Dec. 2001.
- [292] P. Haase, D. M. Cowen, and J. C. Knowles, "Histogenesis of colonic tumours in mice induced by dimethyl hydrazine," *J. Pathol.*, vol. 109, no. 1, p. Px, Jan. 1973.

- [293] N. Thurnherr, E. E. Deschner, E. H. Stonehill, and M. Lipkin, "Induction of Adenocarcinomas of the Colon in Mice by Weekly Injections of 1,2-Dimethylhydrazine," *Cancer Res.*, vol. 33, no. 5, pp. 940–945, May 1973.
- [294] M. Kobaek-Larsen, I. Thorup, A. Diederichsen, C. Fenger, and M. R. Hoitinga, "Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans," *Comp. Med.*, vol. 50, no. 1, pp. 16–26, Feb. 2000.
- [295] R. Siegel, C. DeSantis, and A. Jemal, "Colorectal cancer statistics, 2014," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 64, no. 2, pp. 104–117, Mar. 2014.
- [296] S. Danese and A. Mantovani, "Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin–Yang interplay between inflammation and cancer," *Oncogene*, vol. 29, no. 23, pp. 3313–3323, Jun. 2010.
- [297] S. Danese, A. Malesci, and S. Vetrano, "Colitis-associated cancer: the dark side of inflammatory bowel disease," *Gut*, p. gutjnl-2011-300953, Jan. 2011.
- [298] J. Terzić, S. Grivennikov, E. Karin, and M. Karin, "Inflammation and Colon Cancer," *Gastroenterology*, vol. 138, no. 6, p. 2101–2114.e5, May 2010.
- [299] J. A. Eaden, K. R. Abrams, and J. F. Mayberry, "The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis," *Gut*, vol. 48, no. 4, pp. 526–535, Apr. 2001.
- [300] T. Jess, C. Rungoe, and L. Peyrin-Biroulet, "Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies," *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.*, vol. 10, no. 6, pp. 639–645, Jun. 2012.
- [301] J. Chen and X.-F. Huang, "The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 8, no. 14, pp. 1313–1317, Jul. 2009.
- [302] I. Okayasu, S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki, and R. Nakaya, "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice," *Gastroenterology*, vol. 98, no. 3, pp. 694–702, Mar. 1990.
- [303] L. Roncucci, D. Stamp, A. Medline, J. B. Cullen, and W. R. Bruce, "Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon," *Hum. Pathol.*, vol. 22, no. 3, pp. 287–294, Mar. 1991.
- [304] M. R. Nucci, C. R. Robinson, P. Longo, P. Campbell, and S. R. Hamilton, "Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa," *Hum. Pathol.*, vol. 28, no. 12, pp. 1396–1407, Dec. 1997.
- [305] M. Andrianifahanana, N. Moniaux, and S. K. Batra, "Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, vol. 1765, no. 2, pp. 189–222, Apr. 2006.
- [306] J. R. Gum, J. C. Byrd, J. W. Hicks, N. W. Toribara, D. T. Lampton, and Y. S. Kim, "Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism," *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 11, pp. 6480–6487, Apr. 1989.
- [307] B. Gupta *et al.*, "Identification of High-Risk Aberrant Crypt Foci and Mucin-Depleted Foci in the Human Colon With Study of Colon Cancer Stem Cell Markers," *Clin. Colorectal Cancer*, 2016.
- [308] M. E. V. Johansson and G. C. Hansson, "Immunological aspects of intestinal mucus and mucins," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 16, no. 10, pp. 639–649, Oct. 2016.
- [309] A. Velcich *et al.*, "Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2," *Science*, vol. 295, no. 5560, pp. 1726–1729, Mar. 2002.

- [310] M. Van der Sluis *et al.*, “Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection,” *Gastroenterology*, vol. 131, no. 1, pp. 117–129, Jul. 2006.
- [311] M. E. V. Johansson, M. Phillipson, J. Petersson, A. Velcich, L. Holm, and G. C. Hansson, “The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 39, pp. 15064–15069, Sep. 2008.
- [312] J. W. Birk *et al.*, “Second Harmonic Generation Imaging Distinguishes Both High-Grade Dysplasia and Cancer from Normal Colonic Mucosa,” *Dig. Dis. Sci.*, vol. 59, no. 7, pp. 1529–1534, Jul. 2014.
- [313] G. P. Boivin *et al.*, “Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations,” *Gastroenterology*, vol. 124, no. 3, pp. 762–777, Mar. 2003.
- [314] R. Wang and R. H. Dashwood, “Endothelins and their receptors in cancer: identification of therapeutic targets,” *Pharmacol. Res.*, vol. 63, no. 6, pp. 519–524, Jun. 2011.
- [315] K. Shiga, M. Hara, T. Nagasaki, T. Sato, H. Takahashi, and H. Takeyama, “Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth,” *Cancers*, vol. 7, no. 4, pp. 2443–2458, Dec. 2015.
- [316] H. Ali, M. Dashwood, K. Dawas, M. Loizidou, F. Savage, and I. Taylor, “Endothelin Receptor Expression in Colorectal Cancer. : Journal of Cardiovascular Pharmacology,” *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 36, no. 1, pp. 69–71, 2000.
- [317] Hoosein, Moinuddin M. *et al.*, “Altered endothelin receptor subtypes in colorectal cancer : European Journal of Gastroenterology & Hepatology,” *LWW*.
- [318] G. Egidy, L. Juillerat-Jeanneret, J.-F. Jeannin, P. Korth, F. T. Bosman, and F. Pinet, “Modulation of Human Colon Tumor-Stromal Interactions by the Endothelin System,” *Am. J. Pathol.*, vol. 157, no. 6, pp. 1863–1874, Dec. 2000.
- [319] T. Fukuroda, T. Fujikawa, S. Ozaki, K. Ishikawa, M. Yano, and M. Nishikibe, “Clearance of Circulating Endothelin-1 by ETB Receptors in Rats,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 199, no. 3, pp. 1461–1465, Mar. 1994.
- [320] J. Dupuis, C. A. Goresky, and A. Fournier, “Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 81, no. 4, pp. 1510–1515, Oct. 1996.
- [321] J. H. Kim, S. H. Yang, M. Y. Yu, H. K. Lee, S. Y. Kim, and S. H. Kim, “Dendroaspis natriuretic peptide system and its paracrine function in rat colon,” *Regul. Pept.*, vol. 120, no. 1–3, pp. 93–98, Aug. 2004.
- [322] C. H. Lee, G. W. Ha, J. H. Kim, and S. H. Kim, “Modulation in Natriuretic Peptides System in Experimental Colitis in Rats,” *Dig. Dis. Sci.*, vol. 61, no. 4, pp. 1060–1068, Apr. 2016.
- [323] W. J. Snape, R. Williams, and P. E. Hyman, “Defect in colonic smooth muscle contraction in patients with ulcerative colitis,” *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 261, no. 6, pp. G987–G991, Dec. 1991.
- [324] L. Grossi, K. McHugh, and S. M. Collins, “On the specificity of altered muscle function in experimental colitis in rats,” *Gastroenterology*, vol. 104, no. 4, pp. 1049–1056, Apr. 1993.
- [325] W. Wadie, H. Abdel-Aziz, H. F. Zaki, O. Kelber, D. Weiser, and M. T. Khayyal, “STW 5 is effective in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats,” *Int. J. Colorectal Dis.*, vol. 27, no. 11, pp. 1445–1453, Nov. 2012.

- [326] A. Bissahoyo *et al.*, “Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: effects of dose, route, and diet,” *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.*, vol. 88, no. 2, pp. 340–345, Dec. 2005.
- [327] H. S. Cooper, S. Murthy, K. Kido, H. Yoshitake, and A. Flanigan, “Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation,” *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 4, pp. 757–768, Apr. 2000.
- [328] T. Mikami *et al.*, “Decreased expression of CD44, alpha-catenin, and deleted colon carcinoma and altered expression of beta-catenin in ulcerative colitis-associated dysplasia and carcinoma, as compared with sporadic colon neoplasms,” *Cancer*, vol. 89, no. 4, pp. 733–740, Aug. 2000.
- [329] T. H. Kim, H. Xiong, Z. Zhang, and B. Ren, “beta-Catenin activates the growth factor endothelin-1 in colon cancer cells,” *Oncogene*, vol. 24, no. 4, pp. 597–604, Jan. 2005.
- [330] A. Serafino *et al.*, “Anti-proliferative effect of atrial natriuretic peptide on colorectal cancer cells: Evidence for an Akt-mediated cross-talk between NHE-1 activity and Wnt/ β -catenin signaling,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*, vol. 1822, no. 6, pp. 1004–1018, Jun. 2012.
- [331] T. Morita, T. Nagaki, I. Fukuda, and K. Okumura, “Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells,” *Mutat. Res.*, vol. 268, no. 2, pp. 297–305, Aug. 1992.
- [332] R. Martínez-Zaguilán, E. A. Seftor, R. E. Seftor, Y. W. Chu, R. J. Gillies, and M. J. Hendrix, “Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells,” *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 14, no. 2, pp. 176–186, Mar. 1996.
- [333] N. Raghunand, B. Mahoney, R. van Sluis, B. Baggett, and R. J. Gillies, “Acute metabolic alkalosis enhances response of C3H mouse mammary tumors to the weak base mitoxantrone,” *Neoplasia N. Y. N.*, vol. 3, no. 3, pp. 227–235, Jun. 2001.
- [334] S. Harguindey, G. Orive, J. Luis Pedraz, A. Paradiso, and S. J. Reshkin, “The role of pH dynamics and the Na⁺/H⁺ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin--one single nature,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1756, no. 1, pp. 1–24, Sep. 2005.
- [335] S. J. Reshkin *et al.*, “Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes,” *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 14, no. 14, pp. 2185–2197, Nov. 2000.
- [336] O. De Wever, P. Demetter, M. Mareel, and M. Bracke, “Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth,” *Int. J. Cancer*, vol. 123, no. 10, pp. 2229–2238, Nov. 2008.
- [337] J. J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, and R. A. Brown, “Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 5, pp. 349–363, May 2002.
- [338] H. Li, X. Fan, and J. Houghton, “Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 101, no. 4, pp. 805–815, Jul. 2007.
- [339] Y. Yamamura *et al.*, “Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression,” *Cancer Res.*, vol. 75, no. 5, pp. 813–823, Mar. 2015.
- [340] J. P. Knowles *et al.*, “Endothelin-1 stimulates colon cancer adjacent fibroblasts,” *Int. J. Cancer*, vol. 130, no. 6, pp. 1264–1272, Mar. 2012.
- [341] A. K. Mitra *et al.*, “MicroRNAs reprogram normal fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in ovarian cancer,” *Cancer Discov.*, vol. 2, no. 12, pp. 1100–1108, Dec. 2012.

- [342] A. Toullec *et al.*, "Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading," *EMBO Mol. Med.*, vol. 2, no. 6, pp. 211–230, Jun. 2010.
- [343] J. Tao *et al.*, "Biological Effects of C-type Natriuretic Peptide in Human Myofibroblastic Hepatic Stellate Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 34, pp. 23761–23769, Aug. 1999.
- [344] T. Chrisman and D. Garbers, "Reciprocal antagonism coordinates C-type natriuretic peptide and mitogen-signaling pathways in fibroblasts.," *J Biol Chem*, vol. 274, no. 7, pp. 4293–9, 1999.
- [345] M. Furuya *et al.*, "C-type natriuretic peptide inhibits intimal thickening after vascular injury," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 748, pp. 517–523, Jan. 1995.
- [346] H. Ueno *et al.*, "Local expression of C-type natriuretic peptide markedly suppresses neointimal formation in rat injured arteries through an autocrine/paracrine loop," *Circulation*, vol. 96, no. 7, pp. 2272–2279, Oct. 1997.
- [347] J. G. Porter, R. Catalano, G. McEnroe, J. A. Lewicki, and A. A. Protter, "C-type natriuretic peptide inhibits growth factor-dependent DNA synthesis in smooth muscle cells," *Am. J. Physiol.*, vol. 263, no. 5 Pt 1, pp. C1001-1006, Nov. 1992.
- [348] K. Surendran and T. C. Simon, "CNP gene expression is activated by Wnt signaling and correlates with Wnt4 expression during renal injury," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 284, no. 4, pp. F653-662, Apr. 2003.
- [349] T. Horio *et al.*, "Gene Expression, Secretion, and Autocrine Action of C-Type Natriuretic Peptide in Cultured Adult Rat Cardiac Fibroblasts," *Endocrinology*, vol. 144, no. 6, pp. 2279–2284, Jun. 2003.
- [350] T. Tokudome *et al.*, "Inhibitory Effect of C-Type Natriuretic Peptide (CNP) on Cultured Cardiac Myocyte Hypertrophy: Interference between CNP and Endothelin-1 Signaling Pathways," *Endocrinology*, vol. 145, no. 5, pp. 2131–2140, May 2004.
- [351] D. S. Chen and I. Mellman, "Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle," *Immunity*, vol. 39, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2013.
- [352] G. T. Motz and G. Coukos, "Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression," *Immunity*, vol. 39, no. 1, pp. 61–73, Jul. 2013.
- [353] G. Guruli, B. R. Pflug, S. Pecher, V. Makarenkova, M. R. Shurin, and J. B. Nelson, "Function and survival of dendritic cells depend on endothelin-1 and endothelin receptor autocrine loops," *Blood*, vol. 104, no. 7, pp. 2107–2115, Oct. 2004.
- [354] X. Ma and G. Trinchieri, "Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells," *Adv Immunol*, vol. 79, pp. 55–92, 2001.
- [355] X. Ma and G. Trinchieri, "Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells," *Adv. Immunol.*, vol. 79, pp. 55–92, 2001.
- [356] P. Scott, "IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity," *Science*, vol. 260, no. 5107, pp. 496–498, 1993.
- [357] R. J. Buckanovich *et al.*, "Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy," *Nat. Med.*, vol. 14, no. 1, pp. 28–36, Jan. 2008.
- [358] P. De Vito, "Atrial natriuretic peptide: an old hormone or a new cytokine?," *Peptides*, vol. 58, pp. 108–116, Aug. 2014.
- [359] M. Bilzer, H. Jaeschke, A. M. Vollmar, G. Paumgartner, and A. L. Gerbes, "Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide," *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 276, no. 5, pp. G1137–G1144, May 1999.

- [360] J. Mattana and P. C. Singhal, “Effects of atrial natriuretic peptide and cGMP on uptake of IgG complexes by macrophages,” *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 265, no. 1, pp. C92–C98, Jul. 1993.
- [361] A. M. Vollmar, R. Förster, and R. Schulz, “Effects of atrial natriuretic peptide on phagocytosis and respiratory burst in murine macrophages,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 319, no. 2, pp. 279–285, Jan. 1997.
- [362] A. M. Vollmar, “The role of atrial natriuretic peptide in the immune system,” *Peptides*, vol. 26, no. 6, pp. 1086–1094, Jun. 2005.
- [363] R. Weissleder and M. J. Pittet, “Imaging in the era of molecular oncology,” *Nature*, vol. 452, no. 7187, pp. 580–589, Apr. 2008.
- [364] M. Goetz and R. Kiesslich, “Advances of endomicroscopy for gastrointestinal physiology and diseases,” *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 298, no. 6, pp. G797–G806, Jun. 2010.
- [365] R. Kiesslich *et al.*, “Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo,” *Gastroenterology*, vol. 127, no. 3, pp. 706–713, Sep. 2004.
- [366] T. Meyer, M. Schmitt, B. Dietzek, and J. Popp, “Accumulating advantages, reducing limitations: Multimodal nonlinear imaging in biomedical sciences – The synergy of multiple contrast mechanisms,” *J. Biophotonics*, vol. 6, no. 11–12, pp. 887–904, Dec. 2013.
- [367] L. Li *et al.*, “Layer-resolved colorectal tissues using nonlinear microscopy,” *Lasers Med. Sci.*, vol. 30, no. 5, pp. 1589–1597, Jul. 2015.
- [368] R. Galli *et al.*, “Non-linear optical microscopy of kidney tumours,” *J. Biophotonics*, vol. 7, no. 1–2, pp. 23–27, Jan. 2014.
- [369] J. Liu, “Two-photon microscopy in pre-clinical and clinical cancer research,” *Front. Optoelectron.*, vol. 8, no. 2, pp. 141–151, Jun. 2015.
- [370] X. Xu, J. Cheng, M. J. Thrall, Z. Liu, X. Wang, and S. T. C. Wong, “Multimodal non-linear optical imaging for label-free differentiation of lung cancerous lesions from normal and desmoplastic tissues,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 4, no. 12, pp. 2855–2868, Nov. 2013.
- [371] J. Adur *et al.*, “Optical Biomarkers of Serous and Mucinous Human Ovarian Tumor Assessed with Nonlinear Optics Microscopies,” *PLOS ONE*, vol. 7, no. 10, p. e47007, Oct. 2012.
- [372] J. Adur *et al.*, “Second harmonic generation microscopy as a powerful diagnostic imaging modality for human ovarian cancer,” *J. Biophotonics*, vol. 7, no. 1–2, pp. 37–48, Jan. 2014.
- [373] M. Bianchi *et al.*, “Mouse colorectal cancer an early detection approach using nonlinear microscopy,” *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 24, no. 6, pp. 3419–3426, 2014.
- [374] L.-H. Li *et al.*, “Multiphoton microscopy for tumor regression grading after neoadjuvant treatment for colorectal carcinoma,” *World J. Gastroenterol. WJG*, vol. 21, no. 14, pp. 4210–4215, Apr. 2015.
- [375] S. Zhuo *et al.*, “Label-Free Imaging of Basement Membranes Differentiates Normal, Precancerous, and Cancerous Colonic Tissues by Second-Harmonic Generation Microscopy,” *PLOS ONE*, vol. 7, no. 6, p. e38655, Jun. 2012.
- [376] S. P. Prieto, G. J. Greening, K. K. Lai, and T. J. Muldoon, “Quantitative structural markers of colorectal dysplasia in a cross sectional study of ex vivo murine tissue using

- label-free multiphoton microscopy,” *Proc. SPIE-- Int. Soc. Opt. Eng.*, vol. 9712, Feb. 2016.
- [377] T. W. Bocklitz *et al.*, “Pseudo-HE images derived from CARS/TPEF/SHG multimodal imaging in combination with Raman-spectroscopy as a pathological screening tool,” *BMC Cancer*, vol. 16, p. 534, Jul. 2016.
- [378] J. Yan *et al.*, “Real-time optical diagnosis for surgical margin in low rectal cancer using multiphoton microscopy,” *Surg. Endosc.*, vol. 28, no. 1, pp. 36–41, Jan. 2014.
- [379] P. Campagnola, “Second Harmonic Generation Imaging Microscopy: Applications to Diseases Diagnostics,” *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 9, pp. 3224–3231, May 2011.