

### *Caracterización de biomarcadores asociados con la colitis inflamatoria crónica y su transformación a neoplasia colorectal. Papel de adrenomedulina*

*Talero E, Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, Cárdeno A, Alarcón de la Lastra C, Motilva V.*

#### INTRODUCCIÓN:

El cáncer colorectal (CCR) es una de las complicaciones más severas de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). El riesgo de contraer este tipo de cáncer se incrementa con la duración y extensión de la enfermedad, así como también con la edad en el momento del diagnóstico y el grado de inflamación colónica 1. Hasta el momento actual ninguna base genética puede explicar la predisposición al CCR en este grupo de pacientes. No obstante, la principal alteración genómica que contribuye a la aparición de CCR asociado a colitis ulcerosa (CU) es la inestabilidad cromosómica que conduce a una pérdida de material genético y funcionalidad de algunos genes supresores de tumores como el gen supresor p53 o el gen APC. Por otra parte, numerosas evidencias sugieren que la propia inflamación crónica es el factor etiopatogénico principal para desarrollar CCR asociado a CU 2. Entre las enzimas involucradas destacan COX-2 e iNOS, cuyos productos están relacionados con procesos como la estimulación del crecimiento celular, angiogénesis y supresión de la inmunidad. En la misma línea, determinadas citocinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral alpha (TNF-), interleucinas 1 (IL-1) y 6 (IL-6), o interferon gamma (IFN-) desempeñan un papel clave en la etiopatogénesis del CCR 3.

En la mayoría de los modelos experimentales de EII que evolucionan a CCR la displasia y cáncer se inducen mediante el pre-

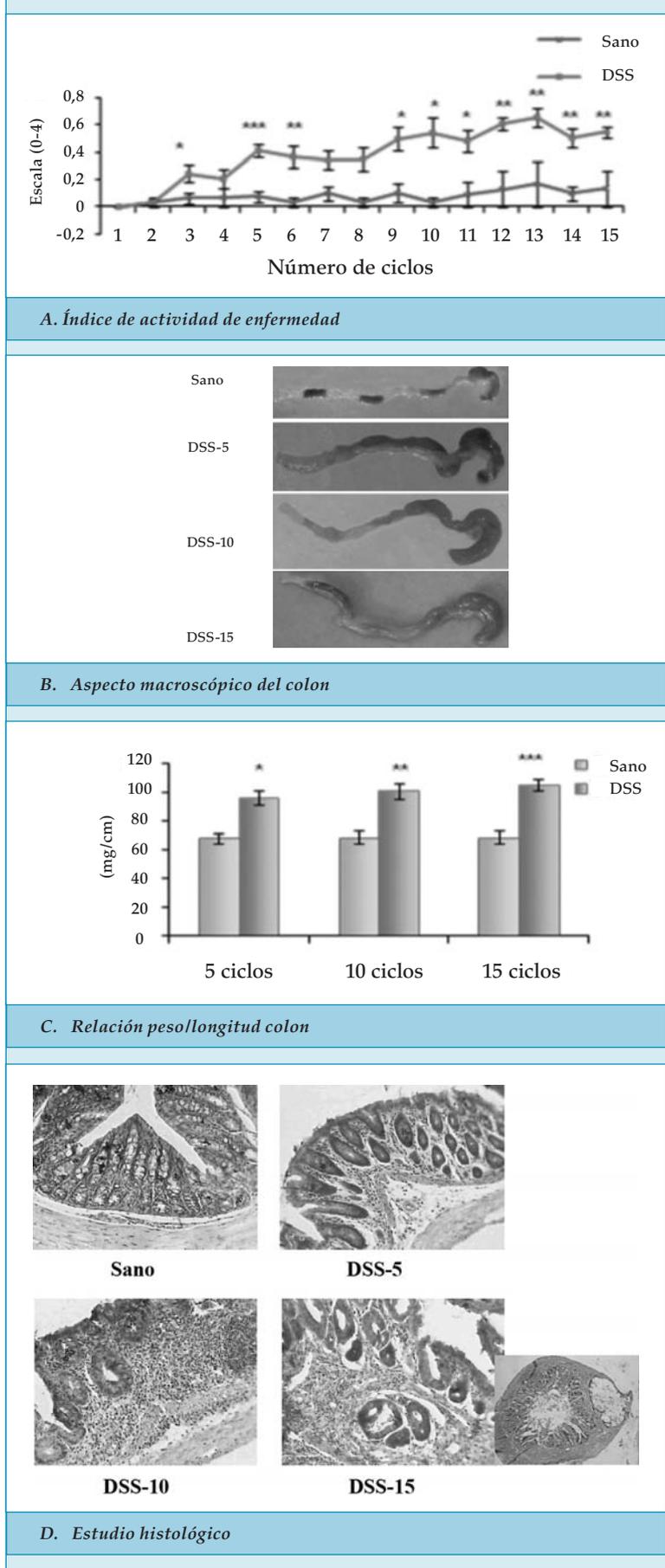
tratamiento con un carcinógeno seguido por la administración de dextrano sulfato sódico (DSS), dando como resultado el rápido desarrollo del CCR. Sin embargo, el tratamiento únicamente con repetidos ciclos de DSS durante largos periodos de tiempo resulta un modelo muy útil para estudiar la secuencia inflamación-displasia-cáncer, que presenta características clínicas e histopatológicas similares a las detectadas en los pacientes que padecen CCR asociado a inflamación crónica 4.

Por otra parte, adrenomedulina es un péptido que está presente en muchos tejidos y fluidos, regulando una variedad de funciones fisiológicas tanto en condiciones normales como patológicas 5. Investigaciones previas han mostrado que este péptido está muy implicado en la carcinogénesis y la progresión de tumores.

De hecho, fue identificado por primera vez en extractos de un feocromocitoma y, desde entonces, un gran número de estudios han mostrado que su expresión se encuentra incrementada en muchas líneas celulares tumorales y tejidos malignos, incluyendo CCR, contribuyendo al crecimiento y desarrollo tumoral 6. En este sentido, adrenomedulina puede considerarse como factor de supervivencia frente al tumor, que ejerce su acción al regular varios aspectos de su fisiología celular que promueven el crecimiento maligno. De hecho, este péptido es un factor mitogénico que incrementa el crecimiento de las células cancerosas.

*Talero E, Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, Cárdeno A, Alarcón de la Lastra C, Motilva V.*  
Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

Figura 1. Estudio de las características macroscópicas e histológicas del colon de animales sanos y tratados con 5, 10 y 15 ciclos de dextrano sulfato sódico (DSS).



También es una molécula angiogénica que promueve la neovascularización en regiones con baja concentración de oxígeno como resultado de su sobreexpresión inducida por hipoxia. Además, es un factor antipoptótico y un supresor de la respuesta inmune.

Partiendo de estos antecedentes, el interés de esta investigación se centró en evaluar los cambios progresivos que se producen en la mucosa intestinal, según un modelo de inflamación crónica, provocado por la ingestión de DSS en el agua de bebida, que evoluciona a displasia y CCR.

Para ello, se analizaron marcadores de inflamación y carcinogénesis, incluyendo  $\beta$ -catenina y antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), la producción de citocinas proinflamatorias y la expresión de determinadas enzimas inducibles en la mucosa colónica. Además, dado que adrenomedulina está implicada en carcinogénesis y que existen muy pocos datos que avalen su implicación en CCR, otro objetivo planteado en este estudio fue analizar la evolución de su expresión en este modelo de CU con derivación a CCR.

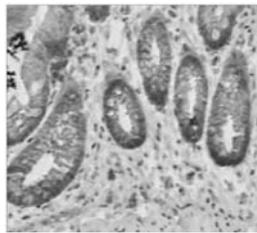
**METODOLOGÍA:**

Como animales de experimentación se utilizaron ratones hembras C57BL/6 de 6 semanas de edad, de peso comprendido entre 15-25 g, mantenidas en condiciones estándar de estabulización (24-25°C, doce horas de luz al día y alimentación controlada) y suministradas por Charles River Laboratorios España. Todos los protocolos llevados a cabo han seguido las recomendaciones de la Unión Europea relativas a la experimentación animal (Directiva del Consejo de Europa 86/609/CEE).

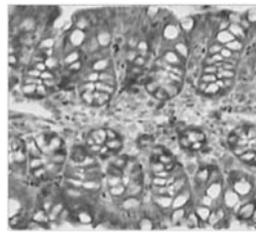
La inflamación crónica fue inducida por administración oral cíclica de DSS al 0.7% durante 7 días consecutivos, seguido por un periodo de agua durante 10 días. Los animales fueron sacrificados después de 5, 10 y 15 ciclos de tratamiento con DSS. Paralelamente, se utilizaron otros 3 grupos de animales que recibieron únicamente agua de bebida durante todos los ciclos de tratamiento (grupos sanos).

Para determinar la gravedad de la colitis se valoraron, durante todo el periodo experimental, una serie de parámetros que incluían la presencia de diarrea, el sangrado rectal y la pérdida de peso de los animales. Estos 3 parámetros se evaluaron por separado en una escala de 0 a 3, propuesta por Gommeaux y cols.8 y el promedio de

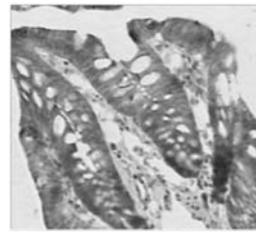
Figura 2. Estudio inmunohistoquímico de diferentes proteínas en la mucosa colónica de animales sanos y tratados con 5, 10 y 15 ciclos de dextrano sulfato sódico (DSS)



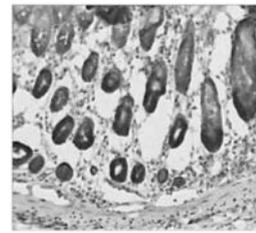
Sano



DSS-5

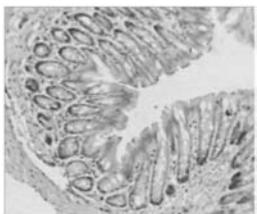


DSS-10

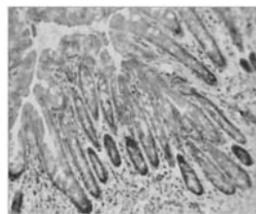


DSS-15

A.  $\beta$ -catenina



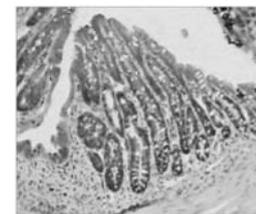
Sano



DSS-5

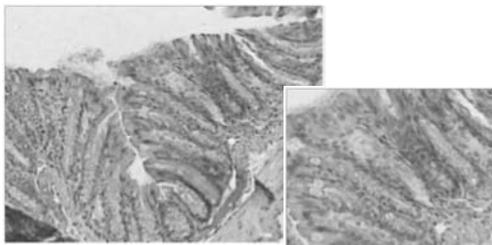


DSS-10

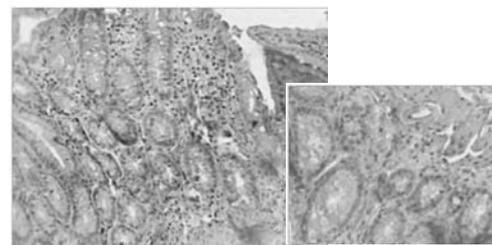


DSS-15

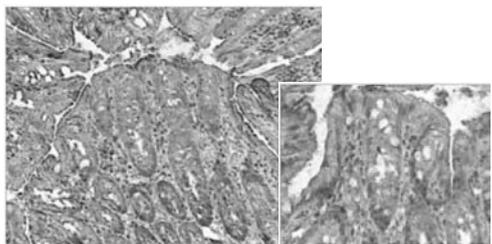
B. Antígeno nuclear de proliferación celular



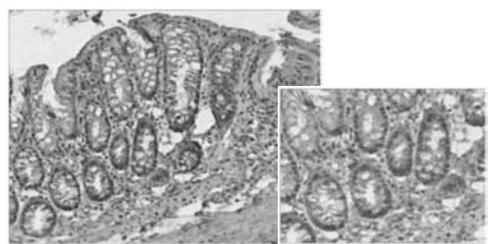
Sano



DSS-5



DSS-10



DSS-15

C. Adrenomedulina

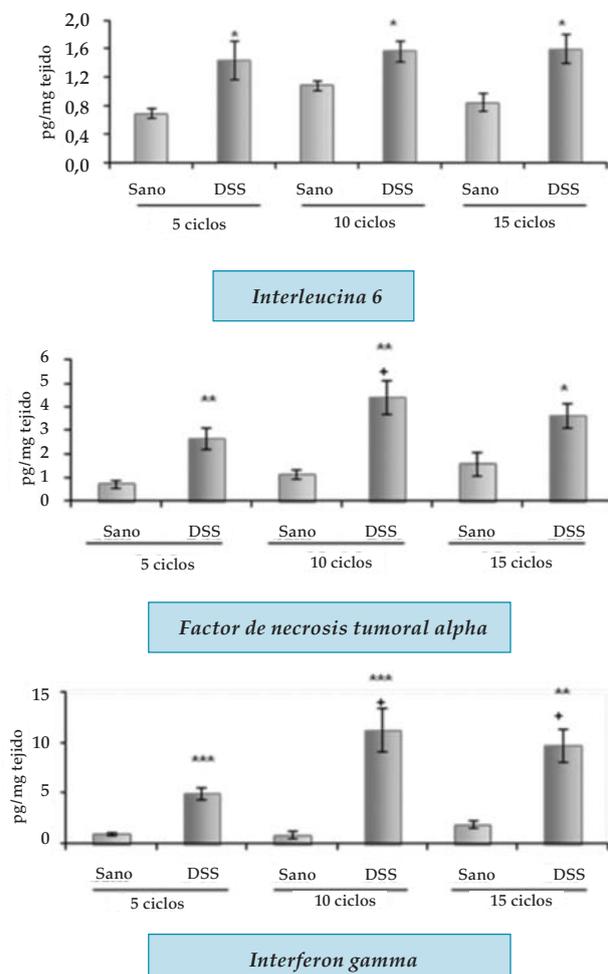
los 3 valores constituyó el Índice de Actividad de Enfermedad (DAI).

Tras el sacrificio de los animales después de 5, 10 y 15 ciclos de tratamiento con DSS, el colon fue extraído, pesado y medido y posteriormente se procedió a la observación de las lesiones macros-

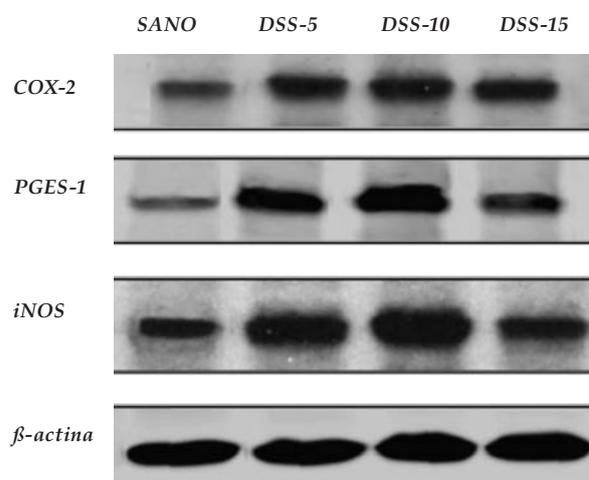
cópicas originadas en el colon de estos animales. Una vez valorado el daño, el colon fue dividido en porciones que se congelaron a -80 °C para las determinaciones bioquímicas posteriores.

Para el estudio histológico, el colon fue dividido en 3 porciones iguales (proximal, medio y

Figura 3. Estudio de la producción de diferentes citocinas proinflamatorias y de la expresión de enzimas inducibles en la mucosa colónica de animales sanos y tratados con 5, 10 y 15 ciclos de dextrano sulfato sódico (DSS).



#### A. Estudio de citocinas proinflamatorias



#### B. Estudio de expresión proteica (Western Blot)

distal), y se realizó la clásica tinción de hematoxilina/eosina que permitió valorar la severidad de la displasia y la presencia de adenocarcinomas.

También se analizaron los siguientes marcadores de inflamación y carcinogénesis en la mucosa colónica procedente de los animales tratados con 5, 10 y 15 ciclos de DSS con objeto de valorar la progresión de la colitis crónica y su transformación a displasia/neoplasia:

- Expresión de PCNA, -catenina y adreno-medulina por métodos inmunohistoquímicos.
- Producción de las citoquinas proinflamatorias TNF-, IFN- e IL-6 por técnica de ELISA (kits comerciales proporcionados por Diaclone (Francia).
- Expresión de las enzimas COX-2, PGES-1 e iNOS en la mucosa colónica por Western Blot.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

El análisis del DAI revela que la enfermedad inflamatoria estuvo ya presente desde el 3º ciclo de DSS y fue incrementándose gradualmente a medida que los ciclos avanzaban (Fig. 1A). Estos resultados se confirmaron tras la observación macroscópica del colon de estos animales.

Es más, la administración de 15 ciclos dio lugar a la aparición de lesiones tumorales en el 55% de los animales, localizándose principalmente en la región media/distal del colon (Fig. 1B). La relación peso/longitud del colon, utilizada como un indicador de inflamación, mostró un aumento significativo en todos los grupos tratados con DSS (Fig. 1C).

El estudio histológico reveló, en los animales tratados con 5 ciclos de DSS, una inflamación moderada, mientras que después de 10 y 15 ciclos se detectó una respuesta inflamatoria más intensa.

También se pudo observar la presencia de lesiones displásicas cuya gravedad se correlacionó con el número de ciclos de DSS administrados. Así, en los animales tratados con 5 ciclos de DSS se detectó una displasia leve, mientras que después de 10 y 15 ciclos se apreció una displasia de mayor grado. Además, en el último periodo estudiado más del 50% de los animales presentaron adenocarcinomas y más aún, algunos desarrollaron tumores con carácter invasivo (Fig. 1D).

Con respecto al estudio de  $\beta$ -catenina, la expresión de esta proteína estuvo limitada especialmente a la membrana celular en los grupos sanos, mientras que en los grupos tratados con DSS fue incrementándose progresivamente a lo largo de los ciclos con una localización citoplasmática y sobre todo nuclear en el último ciclo (Fig. 2A).

La translocación de esta proteína desde la membrana celular al citoplasma y núcleo ha sido descrita previamente tanto en modelos experimentales de CCR como en pacientes que presentan adenocarcinomas asociados a CU 9, considerándose un importante marcador de este tipo de cáncer. En la misma línea, los resultados del estudio de localización del PCNA revelan la presencia de células en proliferación en todos los ciclos ensayados, aunque su expresión fue más intensa en aquellos animales tratados con DSS durante 15 ciclos (Fig. 2B). Investigaciones previas han mostrado que esta elevada proliferación de las células epiteliales durante un proceso inflamatorio crónico se correlaciona con un mayor riesgo de desarrollar displasia y cáncer 10.

El análisis de las citocinas proinflamatorias mostró que todas ellas estuvieron incrementadas significativamente en los animales tratados con los diferentes ciclos de DSS en relación a los grupos sanos. Interesantemente, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  presentaron los mayores niveles de producción en los ratones que recibieron 10 ciclos de DSS (Fig. 3A). Los resultados procedentes del estudio de Western Blot revelan que los mayores niveles de expresión de las enzimas COX-2, PGES-1 e iNOS se detectaron en el 10º ciclo y que, tras 15 ciclos de DSS, la expresión de estas proteínas tiende a disminuir (Fig. 3B).

Por tanto, nuestros datos confirman el hecho de que estas proteínas se inducen en una fase

temprana durante el proceso inflamatorio, sugiriendo su implicación en el inicio y desarrollo del CCR asociado a inflamación crónica.

Los estudios inmunohistoquímicos para adrenomedulina revelaron cambios interesantes de intensidad y localización a lo largo de los ciclos. Así, en los animales tratados con 5 y 10 ciclos de DSS, se visualizó una moderada expresión del péptido en el lado apical del citoplasma de las células epiteliales y en la superficie luminal, aunque en algunas zonas ya se apreció una localización nuclear después de 10 ciclos de DSS.

Sin embargo, en los animales expuestos a 15 ciclos se detectó una expresión más intensa, presentando una localización nuclear en amplias zonas de la mucosa glandular que coincidían con zonas de transformación displásica (Fig. 2C). Estos resultados se correlacionan con los obtenidos por Keleg y cols. 11, quienes demostraron una tinción nuclear de este péptido en adenocarcinoma de páncreas.

## CONCLUSIONES:

La administración de repetidos ciclos de DSS resultó en el desarrollo de colitis inflamatoria crónica, la cual evolucionó a displasia y neoplasia colorectal de manera similar a la secuencia detectada en los pacientes que padecen este tipo de cáncer. Nuestros resultados revelan que en este proceso podrían estar implicadas determinadas proteínas que se inducen en una fase temprana del proceso inflamatorio. Además, los datos expuestos en este estudio confirman la participación del péptido adrenomedulina en la carcinogénesis y en la progresión de tumores, demostrando por primera vez su presencia durante el desarrollo del CCR asociado a la CU. Asimismo, la expresión nuclear de este péptido podría ser un marcador tumoral para la detección del CCR.

## BIBLIOGRAFIA

- Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14:378-89.
- Motilva V, Talero E, Calvo JR, et al. Intestinal immunomodulation. Role of regulative peptides and promising pharmacological activities. *Curr Pharm Des.* 2008;14:71-95.
- Burstein E, Fearon ER. Colitis and cancer: a tale of inflammatory cells and their cytokines. *J Clin Invest* 2008; 118: 464-7.
- Suzuki R, Kohno H, Sugie S, et al. Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 2004; 95: 721-7.
- Zudaire E, Martínez A, Cuttitta F. Adrenomedullin and cancer. *Regul Pept* 2003; 112: 175-83.
- Miller MJ, Martínez A, Unsworth EJ, et al. Adrenomedullin expression in human tumor cell lines. Its potential role as an autocrine growth factor. *J Biol Chem.* 1996;271:23345-51.
- Yeo M, Kim DK, Park HJ, et al. Loss of transgelin in repeated bouts of ulcerative colitis-induced colon carcinogenesis. *Proteomics* 2006; 6: 1158-65.
- Gommeaux J, Cano C, Garcia S, et al. Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 2215-28.
- Mikami T, Mitomi H, Hara A, 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.* 2000;89:733-40.
- Shinozaki M, Watanabe T, Kubota Y, et al. High proliferative activity is associated with dysplasia in ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: S34-S39.
- Keleg S, Kayed H, Jiang X, et al. Adrenomedullin is induced by hypoxia and enhances pancreatic cancer cell invasion. *Int J Cancer.* 2007;121:21-32.