



*Instituto de Medicina y Biología
experimental de Cuyo*



*Instituto de Ciencias
Básicas*

Seminario de Investigación para optar al título de “Licenciada en Ciencias básicas con orientación en Biología”

Título: “Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la acción estrogénica en el cáncer de colon esporádico”

Alumna: Mariana E. Troncoso
Directora: Dra. Erica L. Kreimann
Codirectora: Dra. Susana R. Valdez



Universidad Nacional De Cuyo

Índice

Resumen.....	6
--------------	---

Capítulo I: Introducción

I.I. Cáncer.....	8
I.II. Tejido de colon normal.....	8
I.III. Receptores de estrógenos en el colon.....	9
I.IV. Cáncer de colon.....	10
I.V. Cáncer de colon y estrógenos.....	15
I.VI. Proteína NHERF1.....	16
I.VII. Hipótesis y justificación.....	18
I.VIII. Objetivo General.....	19
I.IX. Objetivos específicos.....	19

Capítulo II: Materiales y Métodos

II. I. Animales.....	21
II.II. Inducción tumoral.....	21
II.III. Ovariectomía.....	22
II.IV. Sacrificio y Necropsia.....	23
II.V. Histología.....	23
II.V.I. Protocolo de inclusión de tejidos.....	23
II.V.II. Hematoxilina & Eosina y análisis inmunohistoquímico.....	24
II.V.II.I. Protocolo Hematoxilina – Eosina.....	24
II.V.II.II. Protocolo de Inmunohistoquímica.....	25
II.V.III. Observación en microscopio.....	27

II.IV. Análisis estadístico.....	28
----------------------------------	----

Capítulo III: Resultados

III.I. Modelo Experimental.....	30
---------------------------------	----

III.I.I. Peso corporal.....	30
-----------------------------	----

III.I.II. Inducción tumoral.....	31
----------------------------------	----

III.II. Influencia de los esteroides ováricos en la iniciación y progresión tumoral en un modelo de cáncer de colon en rata.....	32
---	----

III.II.I Número de tumores por rata.....	32
--	----

III.III. Área tumoral.....	33
----------------------------	----

III.IV. Distribución de tumores.....	34
--------------------------------------	----

III.V. Análisis histopatológico de los tumores.....	36
---	----

III.VI. Inmunohistoquímica.....	37
---------------------------------	----

III.VI.I. Expresión y localización subcelular de la proteína NHERF1 y beta catenina en tumores de ratas control, tratadas con DMH y DMH + OVX.....	38
---	----

Capítulo IV: Discusión y conclusiones

IV.I. Discusión y conclusiones.....	40
-------------------------------------	----

Referencias Bibliográficas.....	42
---------------------------------	----

Apéndice de tablas.....	47
-------------------------	----

Resumen

NHERF1 es una proteína adaptadora de membrana expresada mayoritariamente en epitelios polarizados, interactúa con β -Catenina y forma parte de la ultraestructura de las células epiteliales del intestino y el colon. En condiciones patológicas, en cáncer de mama e hígado, NHERF1 se acumula en el citoplasma y núcleo. En líneas celulares de cáncer de mama, la síntesis de la proteína NHERF1 es regulada por estrógenos. Además, recientemente se ha descrito que esta proteína también es regulada por estrógenos en tejido de colon normal en ratas. Varios estudios epidemiológicos describieron un aumento de la incidencia de cáncer de mama y una reducción de la incidencia de cáncer de colon de hasta un 40% en mujeres menopáusicas sujetas a terapia de reemplazo hormonal. Sin embargo, aún no se han dilucidado los mecanismos por los cuales los estrógenos producirían este efecto. La hipótesis de este trabajo plantea que los estrógenos actúan como protectores en el cáncer de colon y NHERF1 sería una proteína mediadora de esta acción. Los estrógenos mantendrían la síntesis de NHERF1 y su rol estructural en el epitelio del colon mientras que la falta de estrógeno y ausencia de NHERF1 contribuirían al proceso de transformación. Con este objetivo, se estudió la influencia estrogénica en la aparición, multiplicidad y grado tumoral en un modelo de carcinogénesis química con 1,2-dimetilhidracina (DMH) en ratas con y sin ovariectomía (OVX). Mediante inmunohistoquímica se estudió la expresión de la proteína NHERF1 y β -Catenina. En el protocolo, donde la ovariectomía se realizó a la mitad del período de la inducción tumoral, se observó un leve aumento en la cantidad de ratas con tumores 8/10 (80%) vs. 12/17 (70,6%) y una mayor cantidad de tumores por rata (2.87 vs. 1.75) en los grupos DMH+OVX vs. DMH. Adicionalmente, se observó un aumento significativo del área tumoral total por rata en los animales tratados con DMH+OVX lo cual apoya la hipótesis del rol protector de los estrógenos en la carcinogénesis del colon. Contrariamente a lo esperado, se observó abundante expresión de NHERF1 en adenocarcinomas de colon de ratas ovariectomizadas, indicando que la expresión de la proteína NHERF1 en este modelo estaría regulada por otros factores y sería independiente de la función ovárica.

CAPITULO I

Introducción

I.I. Cáncer

El desarrollo del cáncer se origina en la alteración de los genes que actúan en el funcionamiento normal del ciclo celular. En general, las etapas afectadas suelen ser la división y diferenciación celular, la muerte celular programada o apoptosis, los mecanismos de reparación del ADN, etc. Los genes que regulan las distintas etapas del ciclo celular anteriormente mencionadas, se agrupan en dos grandes grupos denominados genes supresores tumorales y protooncogenes. Las alteraciones en estos genes se deben a mutaciones, y durante el proceso de aparición del tumor o proceso tumorigénico es necesaria la acumulación de varias mutaciones a lo largo de la vida de un individuo. Como resultado de estos daños genéticos, las células alteradas no responden a los mecanismos normales de regulación celular adquiriendo una ventaja adaptativa sobre las células normales. Las células tumorales poseen una mayor tasa de proliferación comparado con las células normales, lo que conduce a la formación del tumor (Lodish, 2005).

I.II. Tejido de Colon Normal

El epitelio del colon está formado por glándulas tubulares llamadas criptas de Lieberkühn, donde son abundantes las células caliciformes que secretan mucina. La túnica mucosa del colon está formada por el epitelio y la lámina propia, la cual es muy delgada, en ella se pueden observar folículos linfáticos que pueden extenderse hasta la profundidad de la mucosa. La superficie de la mucosa no posee vellosidades, el epitelio es de tipo cilíndrico, con células absortivas provistas de microvellosidades también llamadas “células con borde en cepillo”. En la base de las criptas se encuentran las células enteroendócrinas y las células madre totipotenciales o “stem cells” las cuales originan al resto de las células de las criptas y se diferencian durante su trayecto hacia la superficie luminal. Debajo de la túnica mucosa se encuentra la túnica submucosa, formada por tejido conectivo laxo y abundante tejido adiposo, la túnica muscular y la túnica serosa (Geneser, 2005). El crecimiento normal de las células epiteliales del colon se mantiene por un balance dinámico que existe entre la renovación y descamación de dichas células en la superficie de las criptas del colon (Johnson y col., 1994). En condiciones patológicas, durante la progresión

del cáncer de colon, se observa la desorganización del epitelio y la invasión en las capas subyacentes lo cual determina el grado de malignidad (Piñols, 1999).

I.III. Receptores de estrógenos en el colon

Los estrógenos forman parte del grupo de hormonas esteroideas, estas son hormonas liposolubles, y por lo tanto pueden atravesar la membrana celular por difusión. Una vez en el citoplasma de la célula, se unen selectivamente a moléculas receptoras que pueden estar en el citoplasma como en el núcleo aunque la actividad de estas hormonas ocurre a nivel nuclear. La hormona forma un complejo hormona-receptor cuando se une a éste, actuando como un factor de transcripción que interacciona con el DNA e induce una respuesta por parte de la célula diana, ya que influye directamente en la síntesis proteica (Podestá, 2008).

El 17 β -Estradiol (E2) es el estrógeno preponderante en humanos, sus funciones varían en relación al tipo de receptor al que se une y a la localización subcelular del receptor. En humanos ambas isoformas del receptor de estrógeno, RE α y RE β ¹, son proteínas que comparten regiones comunes con todos los miembros de la superfamilia de receptores nucleares. Tanto el RE α como el RE β actúan en complejas vías de señalización que conducen a la activación de proteínas quinasas dentro de un mecanismo no genómico rápido, pero también producen la transcripción directa o indirecta de genes diana a través de un mecanismo genómico, ya que interactúan en este último caso directamente con el DNA (Marino y Galluzzo, 2008). La unión de E2 a la población de receptores de estrógenos (RE α y RE β) citosólica induce cambios conformacionales que facilitan la homo/heterodimerización, la traslocación nuclear y la unión a secuencias específicas de reconocimiento al ADN (elementos sensibles al estrógeno; ERE). En este modo de acción genómico clásico, RE α y RE β promueven la transcripción de genes sensibles al E2 (Nilsson y col., 2001). Los estrógenos también actúan por mecanismos no genómicos estimulando los receptores localizados en la membrana plasmática. Este camino de transducción de señales rápidas culmina en la activación de la cascada de proteínas quinasas (Levin, 2005). La naturaleza de estas vías y el papel que desempeñan en la

¹ Receptor de estrógeno α y β

función celular difieren entre el RE α y el RE β . En particular, las señales generadas por el complejo E2-RE α conducen a la célula al ciclo celular y representan la principal determinante de los efectos proliferativos y de supervivencia del E2 (Marino y col., 2003). En contraste, los efectos generados por el complejo E2-RE β retiran a la célula del ciclo celular (Acconcia y col., 2005), representando la clave para entender los efectos antiproliferativos inducidos por el E2 que funcionan tanto durante los procesos de diferenciación como en el cáncer de colon humano (Bardin y col., 2004, Martineti y col., 2005).

El tejido del colon normal expresa dos tipos de receptores de estrógenos siendo predominante el tipo β (Campbell – Tomsom y col., 2001; Qiu y col., 2002; Xie y col., 2004; Cho y col., 2007). El RE β se encuentra en colon en una proporción mucho mayor que la isoforma α y se postula que su acción sería de tipo antiproliferativa bloqueando el paso de G1 a la fase S del ciclo celular. Una alteración o disfunción del RE β podría ser uno de los mecanismos relacionados con el riesgo de contraer cáncer de colon y algunos autores postulan que la expresión de este receptor se perdería en el tejido canceroso (Konstantinopoulos y col., 2003). Sin embargo, en la actualidad existe una gran controversia en relación a la expresión de estos receptores durante la transformación tumoral (Slattery y col., 2005, Qiu y col, 2002, Wada-Hiraike y col., 2006).

I.IV. Cáncer de colon

El cáncer de colon avanza en etapas morfológicamente bien diferenciadas. En la mayoría de los casos, el primer paso es la formación de tumores benignos llamados pólipos y adenomas en el interior de la pared del colon. Si estos pólipos no son extirpados quirúrgicamente, pueden sufrir mutaciones adicionales y formar tumores malignos o carcinomas que luego pueden generar metástasis en otros tejidos u órganos del cuerpo (**Figura 1**). Se ha demostrado que el 80% de los carcinomas de colon derivan de un adenoma pre-existente (Weinberg, 2007). Existen factores alimenticios y estilos de vida que modifican el riesgo de contraer cáncer de colon. Se ha observado, a partir de diversos estudios epidemiológicos, que la incidencia de la enfermedad aumenta con una dieta rica en

grasas saturadas, consumo elevado de alcohol y la vida sedentaria (Stemmermann y col., 1990; Statland, 1992). Por el contrario, el riesgo disminuye con una dieta basada en un mayor consumo de verduras, frutas y fibras acompañado de actividad física (Slattery y col, 1990; Kritchevsky, 1993).

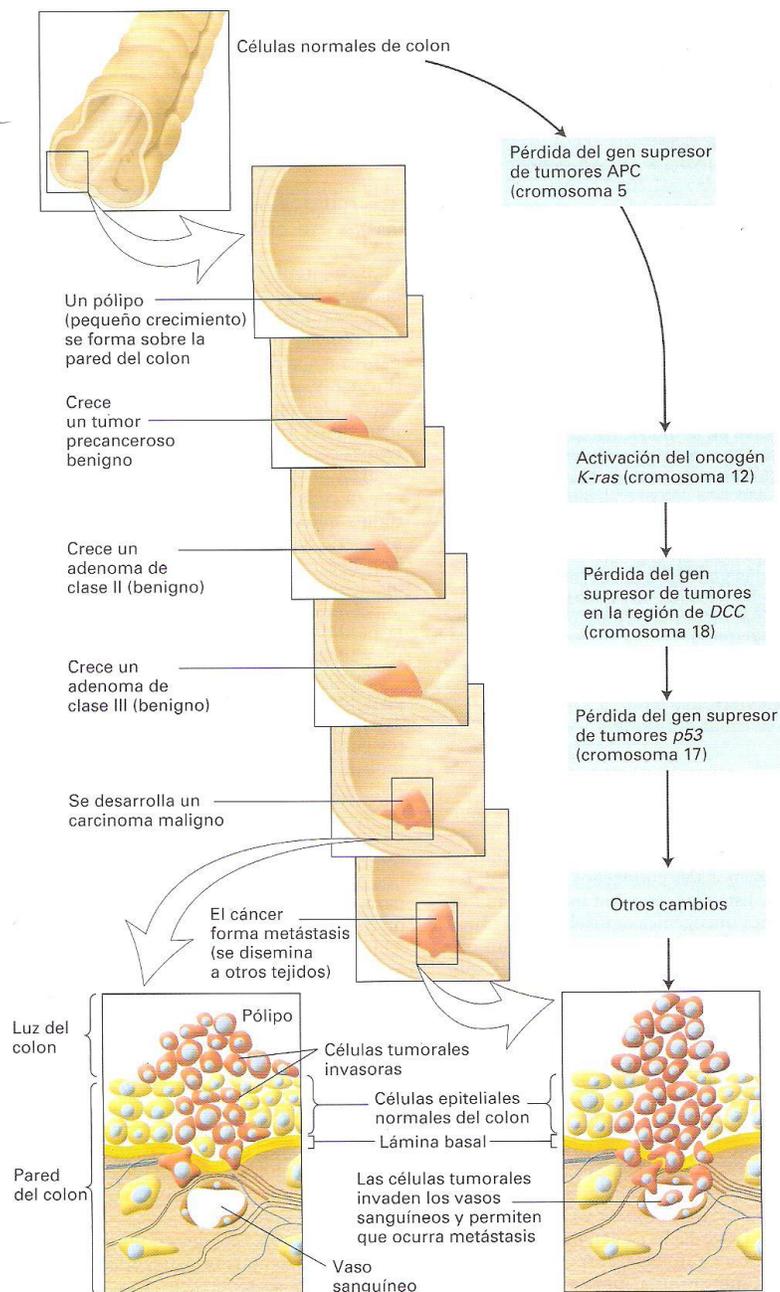


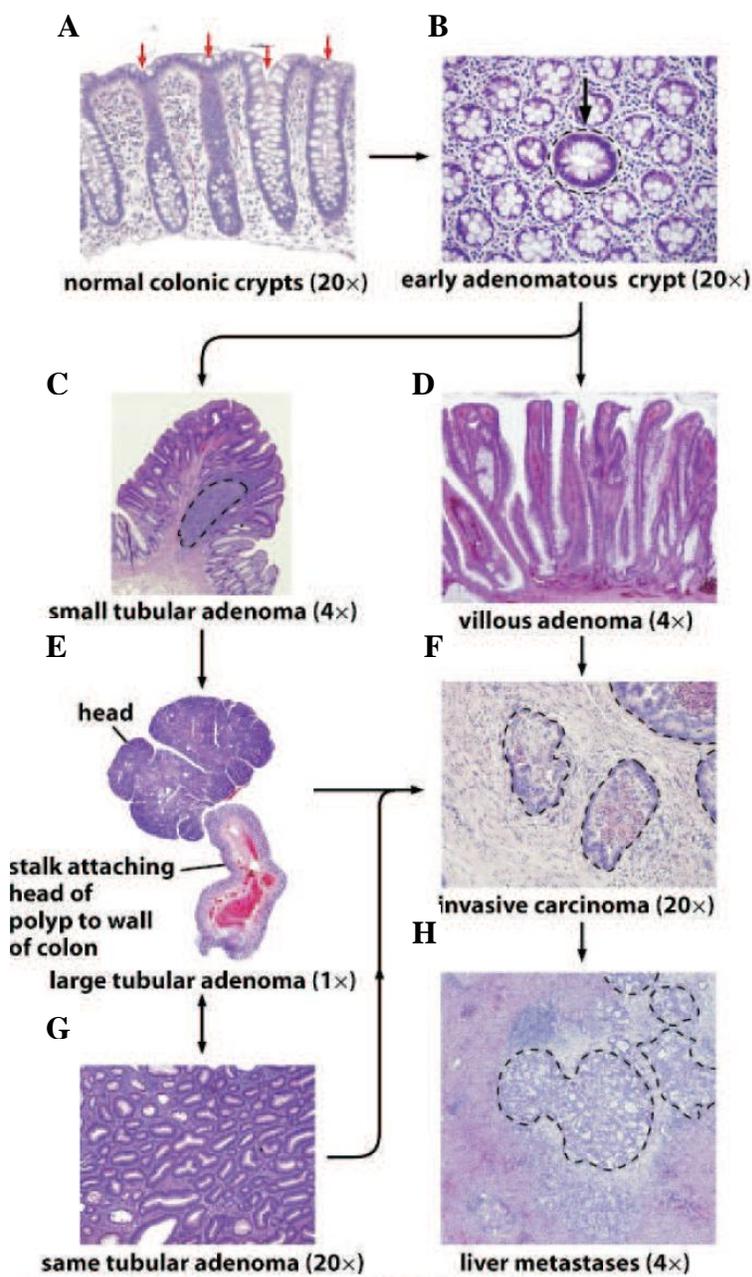
Figura 1: Progresión tumoral en el cáncer de colon indicando las etapas bien diferenciadas desde una forma polipoidea hasta un carcinoma maligno. Se muestran los principales genes involucrados en la progresión tumoral de este tipo de cáncer (Lodish, 2005).

El cáncer de colon se desarrolla en un proceso tumorigénico en múltiples etapas donde se pueden identificar los estadios de anormalidad tisular creciente 1) Hiperplasia: donde se produce un aumento de la proliferación celular, 2) Displasia: células con alteraciones de la orientación 3) Adenoma o pólipo: crecimiento tumoral benigno–no invasivo 4) Carcinoma invasivo: el carcinoma atraviesa la membrana basal e invade las capas subyacentes con distintos niveles de malignidad. Los carcinomas colo-rectales suelen adoptar las formas ulcerada-sésil o polipoidea, siendo esta última forma de mejor pronóstico, ya que la forma ulcerada suele ser más infiltrante que los tumores polipoides exofíticos (Piñols, 1999). El adenocarcinoma es el tumor más frecuente en el colon y se caracteriza por la formación de glándulas con mayor o menor grado de diferenciación (**Figura 2**). Se dividen en carcinomas bien, moderadamente y poco diferenciados. El grado de diferenciación se establece con respecto a la configuración tubular o el grado de polaridad nuclear (Campo y Miguel, 1990), como muestra la siguiente clasificación:

- a- Los adenocarcinomas bien diferenciados presentan túbulos simples o complejos con aspecto pseudocribiforme, las células suelen mantener cierta polaridad con los núcleos basales y son de tamaño uniforme.

- b- Los adenomas moderadamente diferenciados muestran túbulos simples, complejos o ligeramente irregulares y la polaridad nuclear se pierde o es difícilmente identificable.

- c- Los adenocarcinomas poco diferenciados se caracterizan por la presencia de glándulas irregulares o ausencia de su formación con pérdida de polaridad nuclear.



La figura muestra la sucesión de etapas de mayor malignidad que se encuentran en los carcinomas humanos y se supone que siempre ocurren durante el desarrollo de la enfermedad. En el panel A se observan las criptas normales en un corte longitudinal del colon. En el panel B se observa una pequeña cripta adenomatosa junto con criptas normales (flecha negra) en un corte transversal. En un mayor grado de transformación se observa un pequeño adenoma tubular (panel C, zona circunscrita). El crecimiento del adenoma puede desarrollar un adenoma tubular de mayor tamaño y forma pedunculada (E). Con mayor magnificación se observan las características del adenoma pedunculado (G) donde se observan pequeñas islas de las células del carcinoma, rodeadas del tejido del estroma. La forma invasiva del adenoma puede observarse en el panel F donde se observa la metástasis en hígado (F y H) la cual también puede originarse a partir de un adenoma vellosa (D).

Figura 2: Alteraciones histopatológicas del colon que pueden derivar en un carcinoma invasivo (Weinberg, 2007).

El proceso tumorigénico en el colon es uno de los mejores estudiados y se han descrito las mutaciones que ocurren en las distintas etapas de la transición adenoma-carcinoma a medida que avanza la enfermedad. En general, el primer paso en la carcinogénesis involucra la pérdida de función del gen *adenomatous polyposis coli* o APC, que se traduce en la formación de pólipos precancerosos en el colon. Este gen supresor

tumoral, debe tener ambos alelos mutados para originar un fenotipo alterado en las células de la cripta colónica. A nivel molecular, el gen APC codifica una proteína que inhibe la progresión de las células durante el ciclo celular, evitando que la vía de transducción de señales conocida como Wnt (gen que fue descubierto en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y fue denominado así por wingless, que significa sin alas) (Rijsewijk y col., 1987) active ciertos protooncogenes. En forma mecánica, el producto del gen APC, forma parte del complejo que fosforila a la proteína β -catenina para su posterior degradación (**Figura 3**). Como consecuencia de la mutación en APC se impide la degradación de β -catenina en el citoplasma y la proteína se acumula en el núcleo donde activa varios oncogenes como el gen c-myc que participan en la transición de la etapa G1 a S en el ciclo celular (Su y col., 1992, Giles y col., 2003)

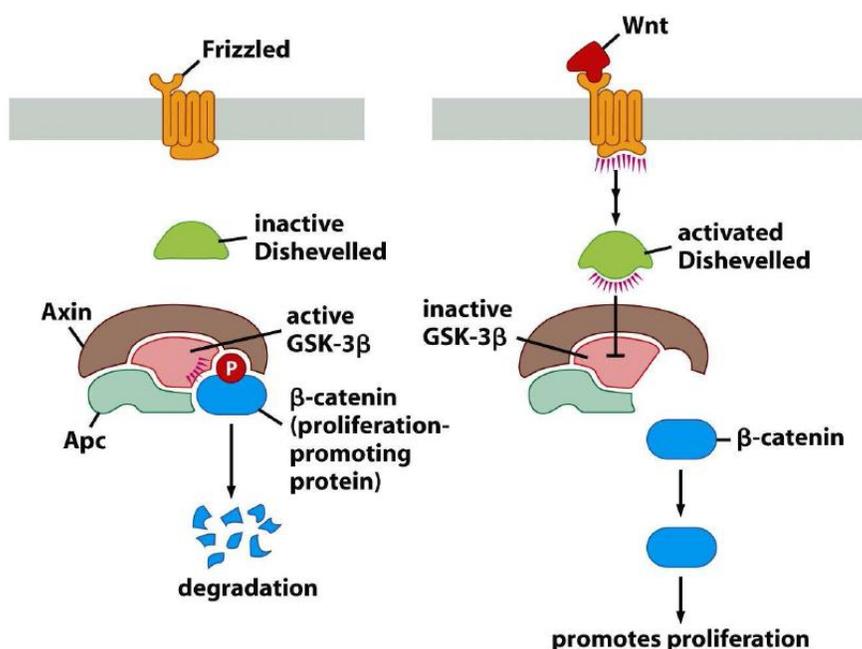


Figura 3: Mecanismo de acción de la vía Wnt, donde se muestra la interacción del producto del gen APC con β -catenina (Weinberg, 2007).

I.V. Cáncer de Colon y Estrógenos

Comprender los efectos de los estrógenos en la progresión del cáncer de colon es de gran relevancia dado que estos pueden presentar efectos contrarios en distintos tipos de cáncer. Estudios epidemiológicos indican que el cáncer de colon es más frecuente en hombres que en mujeres, pero esta diferencia es significativamente mayor entre mujeres premenopáusicas las cuales poseen estimulación estrogénica y hombres de la misma edad (Marino y Galluzzo, 2008). Así, varios estudios epidemiológicos describieron un aumento de la incidencia de cáncer de mama y una reducción de la incidencia de cáncer de colon de hasta un 40% en mujeres menopáusicas que decidieron tomar una terapia de reemplazo hormonal. Sin embargo, los mecanismos de este efecto aún no han sido dilucidados (Heiss y col., 2008). En concordancia con los estudios clínicos en humanos, diferentes ensayos en animales también demostraron un menor riesgo de contraer cáncer de colon en presencia de estrógenos. Por ejemplo, ratas macho expuestas al carcinógeno 1,2-dimetilhidracina exhibieron el doble de riesgo de desarrollar cáncer de colon y una expectativa de vida significativamente menor que sus contrapartes hembras (Di Leo y col., 2001). En un modelo de cáncer de colon dependiente de mutaciones en el gen APC (ratón C57BL/6JMin/+ Min/+) se encontró un número reducido de tumores cuando los ratones ovariectomizados fueron tratados con estradiol (Weyant, 2001).

Estos resultados en conjunto demuestran que el estrógeno tendría efectos protectores sobre el desarrollo del cáncer de colon aunque los mecanismos responsables de esta protección presentan un campo muy prometedor que recién comienza a ser investigado. El estudio de la acción estrogénica en modelos animales de cáncer de colon constituye un importante aporte para el entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados. Dentro de este contexto, se estudiará el rol de los estrógenos en la progresión del cáncer de colon y el rol de la proteína NHERF1, la cual es regulada por estrógenos y es importante en el mantenimiento de la estructura del epitelio intestinal (Morales y col., 2004).

I.VI. Proteína NHERF1

La proteína NHERF1, también llamada EBP50, fue aislada como un factor regulador del intercambiador de Na^+/H^+ aislado inicialmente en células de riñón. Es una proteína adaptadora de membrana y esta formada por 3 dominios proteicos: dos dominios PDZ en tándem y un dominio de unión (EB) a las proteínas de la familia ERM (ezrin – radixin – moezin) (**Figura 4**) (Weinman y col., 1998; Bretscher y col., 2000). Por medio de estos dominios, NHERF1 forma complejos macromoleculares que unen proteínas de membrana al citoesqueleto de actina (Weinman, 2001).

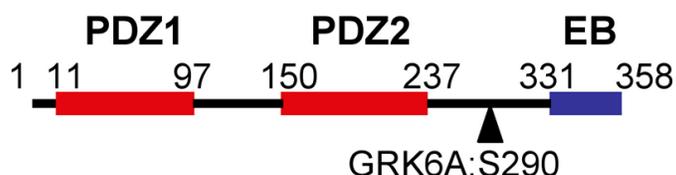


Figura 4: Organización esquemática de la proteína NHERF1, donde se muestran los dos dominios PDZ y la región de unión a ERM (EB). La flecha indica un punto de fosforilación (Kreimann y col, 2007).

Se ha reportado que NHERF1 puede actuar como un gen supresor tumoral a través de la estabilización de complejos de β -catenina/E-cadherina en la membrana plasmática, manteniendo así la integridad de los tejidos epiteliales (Kreimann y col., 2007) (**Figura 5**). En ausencia de NHERF1, las células son capaces de crecer en forma independiente del anclaje al sustrato, se produce una disminución de la expresión de E-cadherina y una pérdida en la correcta localización de β -catenina, produciéndose su acumulación en el citoplasma y generando en las células un fenotipo transformado (Kreimann y col., 2007). Dentro de este contexto, cabe mencionar, que la acumulación nuclear de β -catenina ha sido encontrada en 100% de los cánceres de colon hereditario y en 80% de los esporádicos (Narayan y Roy, 2003). NHERF1 podría cumplir un rol muy importante durante la carcinogénesis en el colon debido a su interacción con β -catenina y hasta el momento su rol en el cáncer de colon no ha sido descrito.

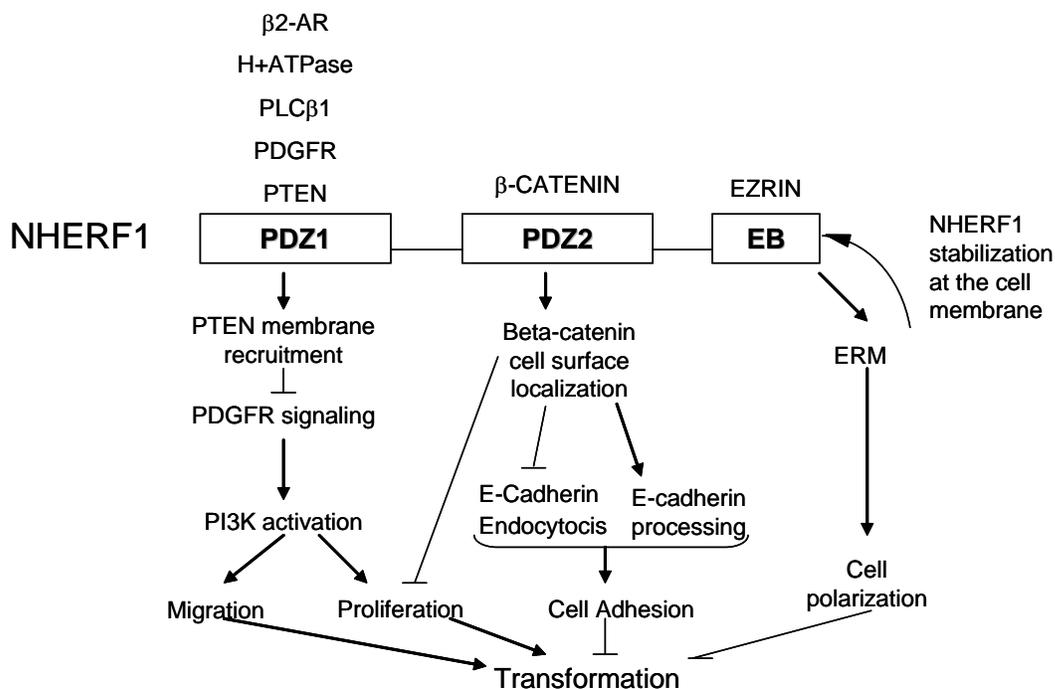


Figura 5: Modelo simplificado del rol de NHERF1 como gen supresor tumoral. NHERF1 podría influenciar el crecimiento, proliferación, migración, adhesión celular y polaridad celular por interacción de sus dominios y región de unión con diversos ligandos (Voltz y col, 2001, Kreimann y col, 2007).

Con respecto a la regulación de NHERF1, se encontró que su síntesis es regulada por estrógenos y suprimida por antiestrógenos (Katzenellenbogen y col., 2000). Sin embargo también se ha observado que ciertas líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-453, MDA-MB-458 Y SKBr3) expresan altos niveles de NHERF1 en ausencia del receptor de estrógenos y contrariamente baja expresión de NHERF1 en células que expresan el receptor de estrógeno constitutivamente (BT20) (Pan y col., 2006). Estos hallazgos sugieren que otros mecanismos, además de la estimulación estrogénica, regulan la expresión de NHERF1 pero hasta la fecha estos factores no han sido identificados. Cuello-Carrión y col., 2010 describieron la regulación de NHERF1 en tejido de colon normal. En este trabajo se observó que los niveles de esta proteína se correlacionan con los niveles hormonales de estrógeno durante el ciclo reproductivo de la rata, como muestra la **figura 6**. Una alta expresión de NHERF1 fue hallada durante los estadios de proestro y estro, disminuyendo en el diestro1, en concordancia con los niveles plasmáticos de estrógeno.

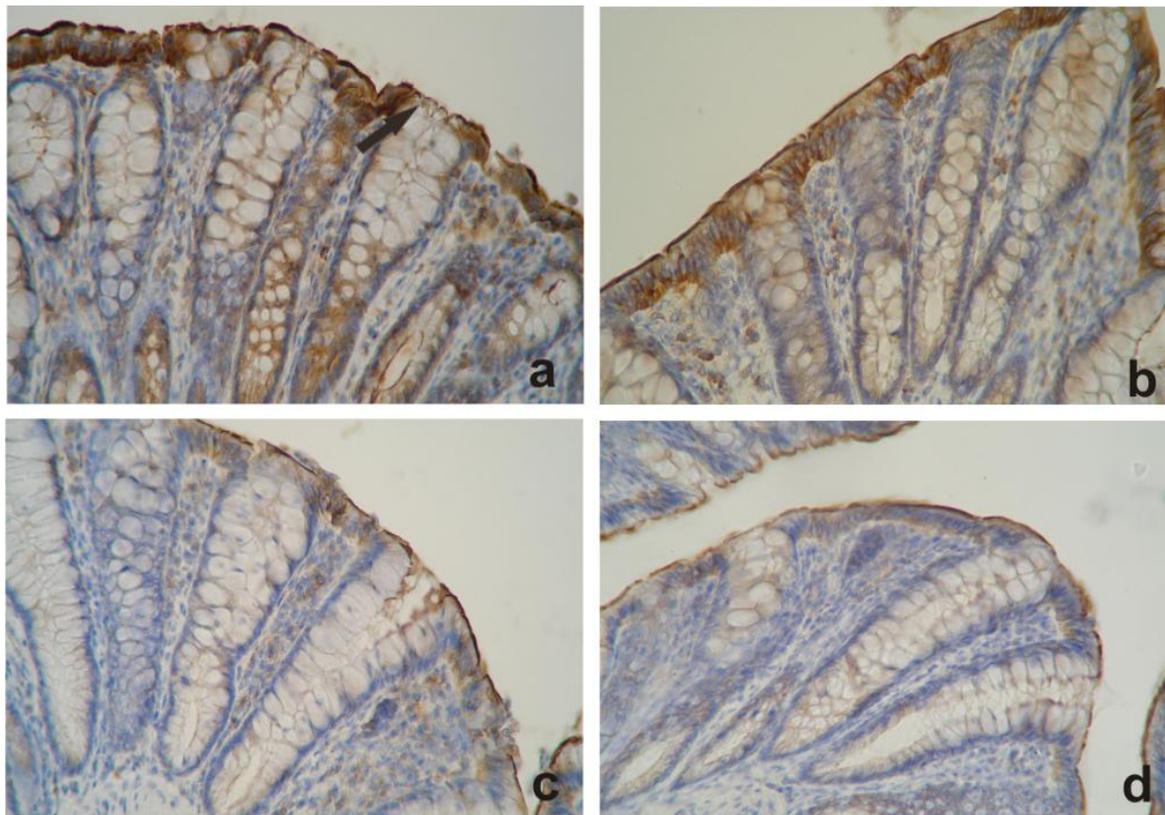


Figura 6: Expresión de NHERF1 en tejido de colon normal durante el ciclo reproductivo de la rata. Panel a) proestro, b) estro, c) diestro 1, d) diestro 2 (Cuello-Carrión y col, 2010). La flecha indica la expresión de NHERF1 en la región apical del epitelio del colon. Magnificación 400X.

I.VII. Hipótesis y Justificación

Los estrógenos actúan como protectores de la estructura del epitelio del colon y NHERF1 es una proteína mediadora de la acción estrogénica. Durante la progresión del cáncer de colon, la expresión y/o localización subcelular de NHERF1 sería modulada por el grado de malignidad y los niveles de estrógenos.

Estudios previos en humanos y modelos animales demostraron la acción protectora de los estrógenos durante la progresión del cáncer de colon (Nanda y col., 1999; Slattery y col., 1999; Chlebowski y col., 2004). El gen de la proteína NHERF1 posee elementos de respuesta a estrógenos en su promotor pero la regulación de la proteína por estrógenos en

distintos tejidos ha sido poco estudiada (Katzenellenbogen y col., 2000). Recientemente se describió la regulación de NHERF1 en colon normal durante el ciclo estral de la rata. Se observó mayor expresión de la proteína en la superficie apical de las células epiteliales en correlación con el pico de estrógenos plasmáticos (Cuello-Carrión y col., 2010). Si bien se desconoce el rol de NHERF1 durante la progresión del cáncer de colon, se han reportado cambios en la localización subcelular de la proteína en cáncer de mama y carcinoma hepatocelular lo cual sugiere que la proteína podría estar involucrada en el desarrollo de la malignidad (Song y col., 2007, Shibata y col., 2003).

I.VIII. Objetivo General

Contribuir a la comprensión de los mecanismos moleculares que involucran la acción de los estrógenos en el colon.

I.IX. Objetivos específicos

1) Con el objetivo de estudiar la influencia estrogénica durante la carcinogénesis del colon se estudiará la acción de esta hormona en la aparición de tumores, multiplicidad de los mismos y grado tumoral en un modelo de carcinogénesis química en rata.

2) Se estudiará la expresión y localización subcelular de NHERF1 y β -catenina en tumores experimentales de colon con y sin estímulo estrogénico.

CAPITULO II

Materiales y Métodos

II.I. Animales

Se utilizaron 32 ratas hembra de la cepa Sprague Dawley de aproximadamente 180–200 g de peso corporal, las cuales fueron mantenidas bajo un régimen luz/oscuridad (luz 6:00 AM hasta 8:00 PM) en el bioterio del IMBECU. Las ratas fueron alimentadas con alimento balanceado (Cargill, Córdoba, Argentina) y agua de la canilla *ad libitum*.

II.II. Inducción Tumoral

Para el desarrollo del modelo experimental de cáncer de colon en rata, los tumores fueron inducidos mediante la administración semanal del carcinógeno 1,2- dimetilhidracina (DMH) (Sigma). La elección del protocolo de carcinogénesis química se basó en que las ratas raramente experimentan la aparición de tumores en el colon en forma espontánea. El uso de este compuesto químico es muy utilizado en laboratorios para el estudio del cáncer de colon por ser un carcinógeno efectivo y selectivo, debido a su actividad alquilante en los ácidos nucleicos del epitelio intestinal y sus propiedades mutagénicas (Maskens, 1981). El uso de DMH como carcinógeno en el tracto gastrointestinal ha permitido observar un gran paralelismo con el cáncer de colon en humanos (Ross 1982).

Los tumores se generaron por la administración semanal de una inyección subcutánea de DMH durante 20 semanas consecutivas. La dosis semanal administrada del carcinógeno fue de 21 mg de DMH/kg de peso corporal. La solución de DMH fue preparada disolviendo 400 mg de DMH en 100 ml de agua destilada estéril conteniendo 37 mg de EDTA como estabilizador, y llevada a pH: 7 con NaOH (1N) (Rubio, 1981). Las ratas fueron observadas diariamente y su peso corporal fue monitoreado 1 vez por semana para evaluar su evolución durante la inducción tumoral. Los experimentos se realizaron siguiendo las normas éticas sugeridas por AACyTAL (Noviembre de 2008, UNCuyo).

II.III. Ovariectomía

Finalizada la inducción con DMH, los animales fueron sacrificados por decapitación luego de 32 semanas desde el comienzo del tratamiento. Durante la necropsia se expuso el tracto gastrointestinal y se tomaron fotos del aspecto del tejido del colon. El tejido del colon se corto longitudinalmente para exponer la parte interna o lumen donde se localizaron los tumores. Se contó el número de tumores por rata, el tamaño y características de cada uno y se procedió a colectar muestras de sangre, tumores y tejidos circundantes.

II.V. Histología

Los tumores y tejidos fueron fijados en una solución de buffer formalina 10% preparado en PBS durante 24 horas, posteriormente fueron deshidratados en alcohol 70% y mantenidos en heladera a 4 °C hasta su procesamiento.

Soluciones empleadas:

PBS 10x

La solución se preparo disolviendo 80g NaCl, 2g KCl, 14,4g NaHPO₄ y 2,4g KH₂PO₄ en 1000 ml de H₂O y llevada a pH: 7.4 con HCl.

Preparación buffer formalina 10%

Se mezclo 1 parte de Formaldehído 40% + 3 partes de PBS 1X.

II.V.I. Protocolo de inclusión de tejidos

Como primer paso se continuó con la deshidratación de las muestras dejadas anteriormente en alcohol 70%. Para cada caso, se realizaron dos lavados sucesivos de 40 minutos cada uno, en alcohol 96%, y posteriormente dos lavados en alcohol 100%, durante 40 minutos y 1 hora respectivamente. Posteriormente se realizaron tres lavados consecutivos con Xileno de 30 minutos cada uno. Finalmente se realizaron 3 pasajes en parafina sintética o Histoplast (Biopack, Buenos Aires, Argentina), previamente llevado a una temperatura de 60 °C en estufa. Finalmente se procedió a armar los tacos orientando los

tejidos para su posterior seccionamiento. La solidificación se completo colocando los tacos durante 30 minutos en la heladera.

II.V.II. Tinción con Hematoxilina - Eosina y análisis inmunohistoquímico

Luego de la inclusión en Histoplast, las muestras de tejido fueron seccionadas (5 μ m) y colocadas en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Se realizó la tinción con hematoxilina-eosina para estudios histopatológicos a partir de un protocolo de rutina utilizado en el laboratorio.

II.V.II.I. Protocolo Hematoxilina & Eosina

Los preparados histológicos fueron sumergidos en:

- 1) 2X xilol 15 min. c/u para eliminar los excesos de parafina.
- 2) 2X etanol 100°, 10 min.,
- 3) 2X etanol 96°, 7 min.
- 4) 1X etanol 70°, 5 min.
- 5) H₂O destilada 5 min. para eliminar exceso de alcohol
- 6) Hematoxilina 2 min.
- 7) H₂O corriente, 10 min.
- 8) H₂O destilada, 5 min.
- 9) Eosina 3 segundos
- 10) H₂O acidificada (H₂O destilada + ácido acético glacial 15 seg.).
- 11) 1X etanol 70°, 5 min.
- 12) 2X etanol 95°, 5 min.
- 13) 2X etanol 100°, 5 min.
- 14) 2X xilol, 10 min.

Colorantes empleados:

Hematoxilina de Harris:

Cristales de Hematoxilina.....	5,0 g.
Alcohol 100%.....	50,0 ml.
Alumbre potásico.....	100,0 g.
Agua destilada.....	1000,0 ml.
Óxido de mercurio.....	2,5 g.

Se añaden 2-4 ml. de ácido acético glacial por cada 100 ml de solución a fin de mejorar la tinción de los núcleos celulares.

Eosina alcohólica:

Se prepara la solución stock

Eosina Y, soluble en agua.....	1,0 g.
Agua destilada.....	20 ml.

Se disuelve y añade:

Alcohol 95%.....	80 ml.
------------------	--------

La solución de trabajo se prepara como sigue:

Solución stock de eosina.....	1 parte
Alcohol 80%.....	3 partes

Justo antes de su uso se añaden 0,5 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml.

Las secciones sin teñir se utilizaron para el análisis inmunohistoquímico siguiendo el protocolo de Fanelli y col., 1998. En los cortes sin teñir se estudió por inmunohistoquímica la expresión y distribución subcelular de la proteína NHERF1 y β -catenina analizando la expresión y localización subcelular en el microscopio óptico Nikon Eclipse luz (E 200).

II.V.II.II. Protocolo de inmunohistoquímica

Anticuerpos: como isotipo control se utilizó la inmunoglobulina de ratón no específica (IgG1) y suero pre-inmune de conejo (DAKO, Kingsgrove, NSW, Australia). Los anticuerpos anti-NHERF1 (polyclonal rabbit antibody, PA1-090) fueron obtenidos de Affinity BioReagents (Rockford, IL, USA) y β -catenina de Biosciences Pharmingen (USA).

Cada ensayo de inmunohistoquímica se desarrolló insumiendo dos días consecutivos:

Primer Día:

Las muestras colocadas en los portaobjetos previamente deshidratadas, fueron hidratadas nuevamente realizando sucesivas incubaciones en:

- 1) 2X xileno de 15 min
- 2) 2X etanol 100%, 10 min
- 3) 2X etanol 96%, 5 min
- 4) 1X etanol 70%, 5min
- 5) 1X H₂O, 5 min

Una vez realizada la hidratación, se realizó la recuperación antigénica (con el fin de exponer los epitopes que podrían estar enmascarados por la fijación en formol) mediante la ebullición de las muestras en buffer citrato (0,01M pH 6,0) durante 30 minutos. La peroxidasa endógena fue bloqueada con azida sódica (pH 7,4, buffer azida + PBS + H₂O₂) durante 30 min. Luego se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas en solución con leche descremada 10% durante 30 minutos. Las muestras de tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios (NHERF1 1:500, y β -catenina 1:300) durante toda la noche a 4 °C en cámaras de humedad.

Segundo día:

Luego de la incubación con el primer anticuerpo se realizó un lavado con autobuffer (Tris-NaCl o PBS + detergente) durante 10 minutos. Las muestras entonces fueron incubadas con el polímero anti-mouse/anti-rabbit, el cual se comporta como el anticuerpo secundario, [Dako EnVision system, horseradish peroxidase, diaminobenzidine (DAB)] durante 1 h en cámara húmeda. Posteriormente se lavó el polímero con autobuffer durante 10 minutos y se realizó el revelado con diaminobencidina (DAB) en cámara húmeda el cual actúa como sustrato para la reacción colorimétrica. La reacción se detuvo con agua de la

canilla y los portaobjetos fueron contrastados con hematoxilina. El control negativo fue procesado de igual manera, excluyendo el anticuerpo primario. Finalmente se realizó el montaje de los portaobjetos con Bálsamo de Canadá. Se trabajó bajo campana, con cuidado para evitar que el preparado se seque. Se puso una gota de bálsamo sobre el preparado y luego se cubrió el portaobjetos con un cubreobjetos apretando con cuidado para eliminar burbujas de aire. Se dejó secar aproximadamente 90 minutos.

Soluciones empleadas en inmunohistoquímica:

PBS: (pH: 7.4)

Preparar solución stock:

Fosfato dibásico de sodio 1 M (88.99 g (hidratado) o 70.98 g (anhidro) en 500 ml

Fosfato monobásico de sodio anhidro 1 M 60 g en 500 ml

PBS 2X:

77.4 ml de fosfato dibásico de sodio 1M

22,6 ml de fosfato monobásico de sodio

csp 1000 con agua destilada

NaCl 2X (0.4 M):

Disolver 11.7 gramos de cloruro de sodio en agua destilada en 500 ml

Preparación de PBS:

Se mezcla 1 volumen de 2X PBS y 1 volumen de NaCl

Buffer citrato 0.01 M pH:6:

Se disuelven 100 ml de agua destilada y 1.05 gramos de Acido Cítrico monohidratado + 1.47 gramos de citrato de sodio dihidratado. Se lleva a pH: 6 con NaOH

II.V.III. Observación en microscopio óptico

Las secciones histológicas fueron examinadas en un microscopio Nikon Eclipse luz (E 200) conectado con una cámara digital Nikon Coolpix S510, 6.0 megapíxeles.

II.IV. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Excel, con el cual se construyeron los gráficos a partir de los datos obtenidos luego del tratamiento de inducción tumoral y el sacrificio de los animales. Las comparaciones estadísticas se hicieron con la prueba t de student utilizando el programa Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

CAPITULO III

Resultados

III.I Modelo experimental

III.I.I. Peso Corporal

La evolución del peso corporal de las ratas durante la inducción tumoral se muestra en el **gráfico 1**. En todos los grupos se observó aumento del peso corporal a medida que el tratamiento avanzaba, tanto en el grupo de ratas control como en el grupo de ratas inyectadas semanalmente con 1,2- dimetilhidracina (DMH) y DMH + ovariectomía (DMH+OVX). Las ratas a las cuales se les practicó la ovariectomía comenzaron a aumentar de peso con mayor rapidez luego de quitarles el aporte endógeno de estrógenos, en comparación con las ratas no ovariectomizadas que mantuvieron un aumento de peso uniforme a lo largo del tratamiento, similar al grupo control. Antes de la ovariectomía no se observaron diferencias significativas en el peso de las ratas de los 3 grupos experimentales ($p=0.7719$).

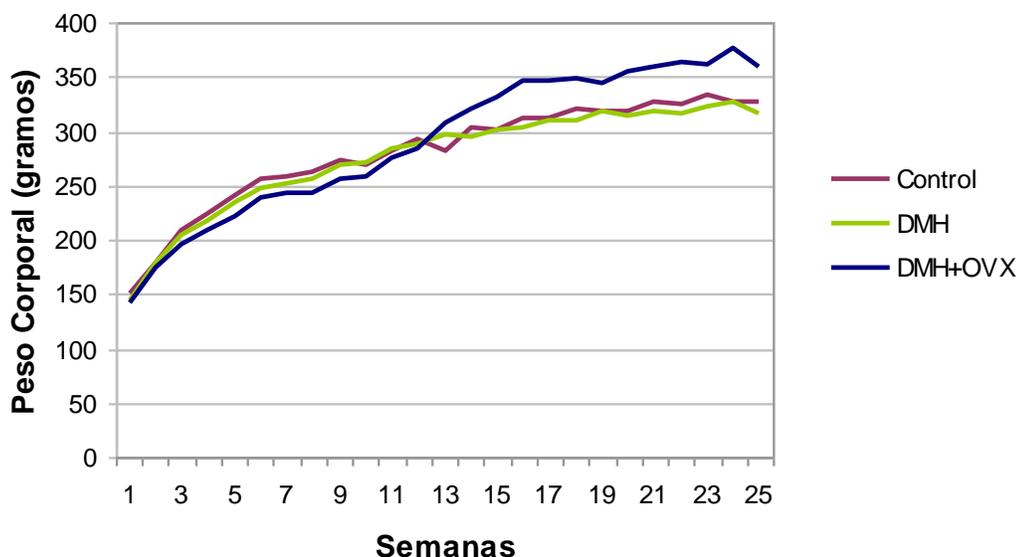


Gráfico 1: Promedio de los pesos semanales correspondientes a: grupo de ratas control (línea púrpura); grupo de ratas que recibieron el tratamiento con DMH y no fueron ovariectomizadas (línea verde); y grupo de ratas que recibieron el tratamiento con DMH y que fueron ovariectomizadas a las 10 semanas de comenzada la inducción tumoral (línea azul).

Después de la ovariectomía las ratas de los grupos control y DMH no mostraron diferencias significativas, sin embargo el grupo DMH+OVX aumento significativamente de peso ($p < 0,0001$). Al final del tratamiento se pudo observar un discreto descenso del peso en los animales en el grupo DMH y DMH+OVX. La Tabla A (apéndice) muestra la evolución de los pesos corporales durante el tratamiento.

III.I.II Inducción Tumoral

El protocolo experimental utilizando el carcinógeno DMH fue exitoso, se observó la formación de tumores en los grupos tratados con DMH y DMH+OVX pero no en el grupo control tratado con vehículo (**Figura 1**). Se observó variación en la localización de los tumores, algunos se formaron en la primera sección del colon (1/3), en ciertas ratas la aparición fue en la zona central (2/3) y en otras en la región cercana al recto (3/3). Las ratas control no desarrollaron ningún tipo de lesión. Las ratas no mostraron signos de dolor durante la totalidad del tratamiento, sorpresivamente tampoco se observó sangrado en las heces a pesar de la presencia de los tumores.



Figura 1: Vista macroscópica de las lesiones. Luego del protocolo de inducción tumoral se obtuvo un total de 44 tumores en el colon. Los animales control sólo recibieron la inyección del vehículo y el tejido se observó normal. El lote tratado con DMH y DMH+OVX desarrolló tumores mayoritariamente en el colon y recto pero también se encontraron algunas lesiones en el estómago e intestino delgado.

III.II. Influencia de los esteroides ováricos en la iniciación y progresión tumoral en un modelo de cáncer de colon en rata

En el grupo DMH+OVX, el porcentaje de ratas que desarrollaron tumores fue del 80%, es decir que de un total de 10 ratas, 8 formaron tumores, siendo el número total de éstos 27. En el grupo DMH, el porcentaje de formación de tumores fue de un 70%, es decir que de un total de 17 ratas, 12 expresaron tumores, siendo el número total de estos 25, como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1: Número y frecuencia de tumores en el tracto digestivo de ratas tratadas con vehículo, DMH con y sin ovariectomía (OVX)

	Vehículo	DMH	DMH+OVX
N° de Ratas	5	17	10
N° de Ratas con Tumor	0	12	8
N° de tumores totales	0	25	27

III.II.I. Número de tumores de colon por rata

Se cuantificó el número de tumores de colon por rata y se calculó el promedio de los mismos para los grupos tratados con DMH y DMH+OVX (**Gráfico 2**, ver Tabla B en apéndice). El cálculo del promedio para cada grupo experimental se realizó haciendo la sumatoria del número de tumores dividido el número de ratas que expresaron tumores.

Si bien se observó un aumento en el número de tumores de colon por rata en los animales tratados con DMH+OVX con respecto al grupo DMH, el análisis estadístico no mostró una diferencia significativa de este aumento para el tratamiento DMH+OVX ($p=0.1052$).

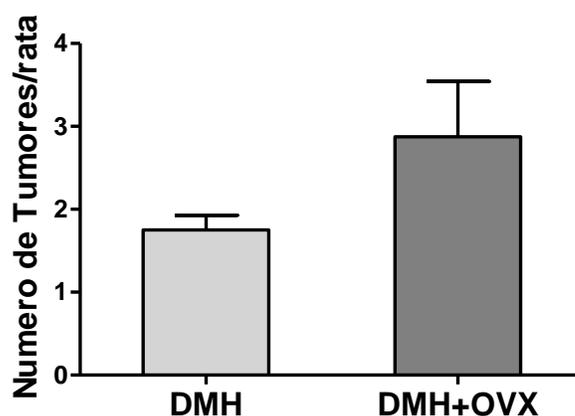


Gráfico 2: Número de tumores de colon por rata, para los tratamientos con DMH (valor promedio= $1,75 \pm 0,6216$) y DMH+OVX (Valor promedio= $2,875 \pm 1,885$). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en el número de tumores por rata ($p=0,1052$).

III.III. Área Tumoral

El área tumoral corresponde a la superficie o extensión del área afectada en el colon. Se calculó esta área para cada uno de los tumores hallados en el colon de cada rata. Para ello, luego de la eutanasia se procedió a exponer el tracto gastrointestinal y los tumores fueron medidos antes de ser extirpados de los tejidos correspondientes. Se tomaron las medidas de cada tumor y con esos valores se calculó el área de cada uno. Luego se determinó el área tumoral por rata sumando las áreas de cada tumor (Tabla 2) y el área tumoral total sumando todas las áreas tumorales por rata para cada tratamiento (Tabla 3). Para poder realizar el cálculo de las áreas de cada tumor se utilizó la fórmula del área de un óvalo ($A = \pi \times a \times b$) como se detalla en la Tabla C (apéndice), siendo a y b los semiejes mayor y menor del óvalo. Se eligió calcular las áreas con esta fórmula ya que era la que más se aproximaba a la forma que tenían los tumores.

Tabla 2: Área tumoral promedio de cada grupo experimental, calculada como la sumatoria de las áreas tumorales por rata dividido el número de ratas que expresaron tumores.

Nº Rata	Área tumoral por rata(mm ²)	
	DMH	DMH + OVX
1	48,67	90,27
2	21,58	76,73
3	47,88	98,91
4	50,24	32,97
5	28,54	36,89
6	41,2	66,72
7	10,99	58,86
8	4,71	71,43
9	9,42	-
10	23,55	-
11	38,46	-
12	22,76	-
Áreas promedio	28,98± 16,11	67,58± 24,58

Tabla 3: Valor de las áreas tumorales totales de las ratas que recibieron el tratamiento con DMH y DMH+OVX. En las ratas control no hubo desarrollo de tumores.

Tratamiento	Área Tumoral total mm ²
Control	0
DMH	299,08
DMH+OVX	540,63

Además, se observó un aumento significativo del área tumoral en el grupo DMH+OVX el cual carecía de la estimulación estrogénica plasmática comparado con el grupo DMH (**Gráfico 3**).

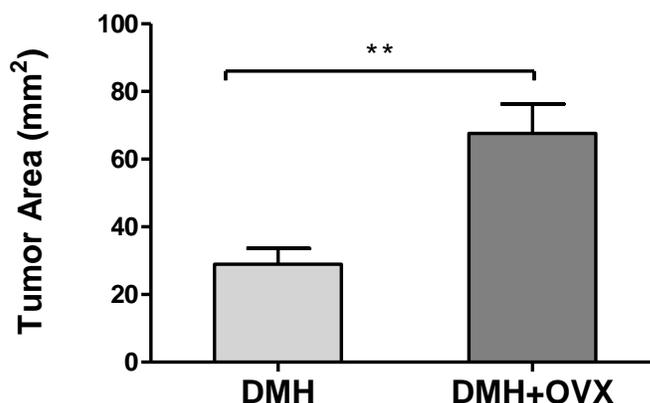


Gráfico 3: Representa el área tumoral promedio de ratas que recibieron el tratamiento de carcinogénesis química con DMH ($28,98 \pm 16,11 \text{mm}^2$) y DMH+OVX ($67,58 \pm 24,58 \text{mm}^2$). La prueba t de student mostró un valor significativo $p=0.0038$

III.IV. Distribución de tumores

No se observaron diferencias substanciales en la distribución de tumores en el tracto digestivo de las ratas tratadas con DMH y DMH+OVX. En los animales sin ovariectomizar se encontraron tumores en estómago, intestino delgado, colon y recto. En las ratas ovariectomizadas se hallaron tumores solo en intestino delgado, colon y recto, tal como se indica en la Tabla D (apéndice) y el **Gráfico 4**.

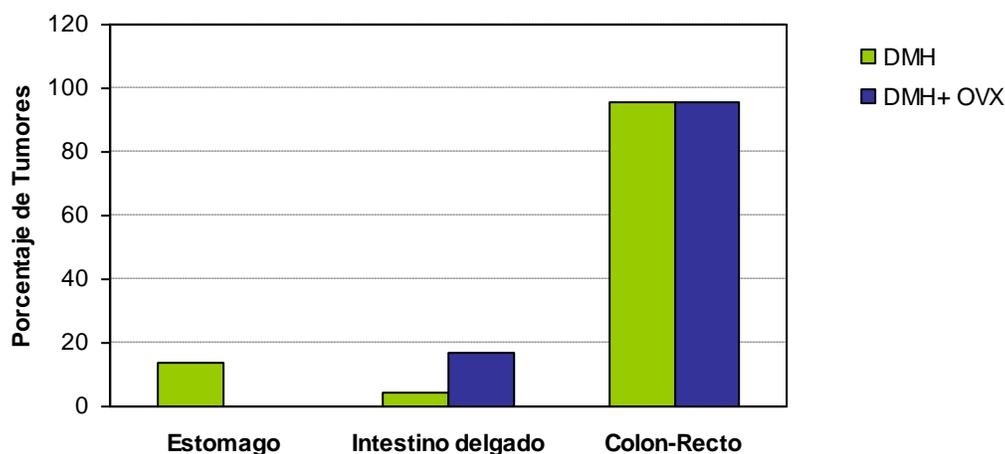


Gráfico 4: Distribución de tumores (expresada como porcentaje) en el tracto digestivo de ratas tratadas con DMH (estómago: 13,3%, intestino delgado: 4,5%, colon/recto: 84%) y DMH+OVX (estómago: 0%, intestino delgado: 16,7%, colon/recto: 85,15%).

Para evaluar la distribución de tumores dentro del colon, el mismo fue dividido en tres tercios comenzando por la zona proximal (1/3), media (2/3) y zona del colon-recto (3/3). Se determinó que un 48 % de los tumores de las ratas tratadas con DMH+OVX se localizó en el segundo tercio del colon, a diferencia de las ratas tratadas sólo con DMH en las cuales se observó una distribución bastante uniforme, como se indica en la tabla E (apéndice) y en el **gráfico 5**. Esta distribución no mostró diferencias significativas.

Porcentaje de tumores distribuidos en el tracto digestivo

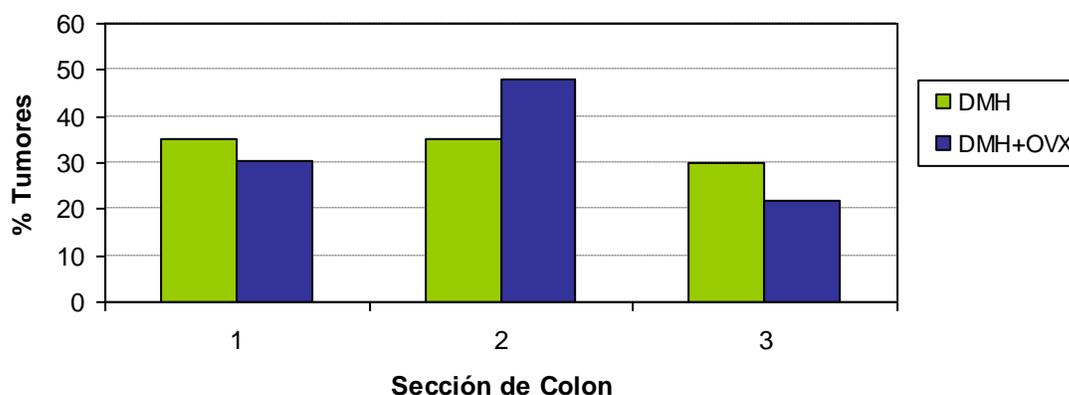


Gráfico 5: Porcentaje de tumores distribuidos en los distintos sectores del colon, primer, segundo y tercer tercio, en ratas tratadas con DMH y DMH OVX. La distribución no dio una diferencia significativa $p=0,34$.

III.V. Análisis Histopatológico de los tumores

El análisis histopatológico confirmó la formación de adenocarcinomas moderadamente diferenciados (**A**) y adenocarcinomas mucinosos (**AM**) en los grupos de ratas tratadas con DMH y DMH+OVX. En general, no se observó la formación de metástasis, a excepción de un solo caso en ratas del grupo DMH (**Figura 2**).

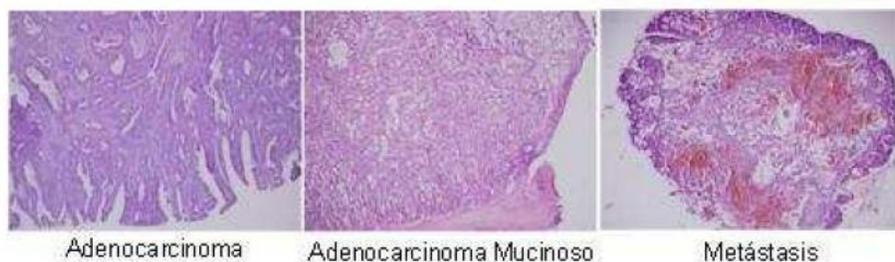


Figura 2: Tipos tumorales observados en ratas tratadas con el carcinógeno: adenocarcinoma (A), adenocarcinoma mucinoso (AM) y metástasis (MET).

La cantidad y tipos tumorales están indicados en la Tabla 4 y 5. En el **gráfico 6** puede observarse el porcentaje de tipos tumorales para cada grupo experimental.

Tabla 4: Tipos tumorales expresados en ambos grupos de ratas (DMH y DMH+OVX) obtenidos a partir del análisis histopatológico de los tumores y tejidos colectados*.

	DMH	DMH+OVX
AM	3	2
A	7	5
Metastasis	1	-
Tumores Totales	11	7

*Tumores que pudieron ser interpretados a nivel patológico.

Tabla 5: Porcentaje de los tipos tumorales expresados en los animales tratados con DMH y DMH+OVX, observados en los cortes histológicos analizados y descritos durante el análisis histopatológico

	AM	A	MET
DMH	27,27	63,63	9,09
DMH+OVX	28,57	71,43	0

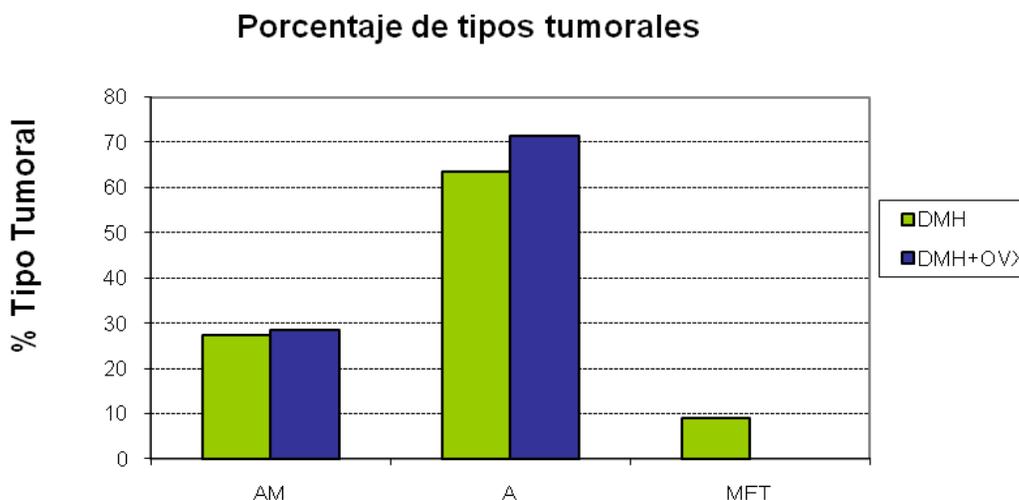


Gráfico 6: Porcentaje de los tipos tumorales observados en los cortes histológicos analizados y descritos a partir de la histopatología, para ambos grupos de animales (DMH y DMH + OVX)

III.VI. Inmunohistoquímica

III.VI.I Expresión y localización subcelular de la proteína NHERF1 y β -catenina en tumores de ratas control, tratadas con DMH y DMH + OVX

En el colon normal la proteína NHERF1 se expresa en la región apical de las células epiteliales del colon. La proteína β -catenina se localiza predominantemente en la membrana basolateral del epitelio (**Figura 3**, panel colon normal). En el tejido tumoral, NHERF1 se expresó en el citoplasma de las células de los tumores de ratas tratadas con DMH y, contrariamente a lo esperado, también se expresó en los tumores de ratas tratadas con DMH+OVX; en ambos casos hubo expresión en los cordones tumorales. En los carcinomas mucinosos se observó la expresión de NHERF1 en los cordones tumorales y en células desprendidas de la masa tumoral inmersas en zona de mucus, como indica la flecha en la **Figura 3**. El patrón de expresión y localización subcelular citoplasmática fue similar en los dos grupos experimentales. La proteína β -catenina se expresó en el citoplasma y en el núcleo de células tumorales, en concordancia con datos de la literatura (Hao XP y col., 2001).

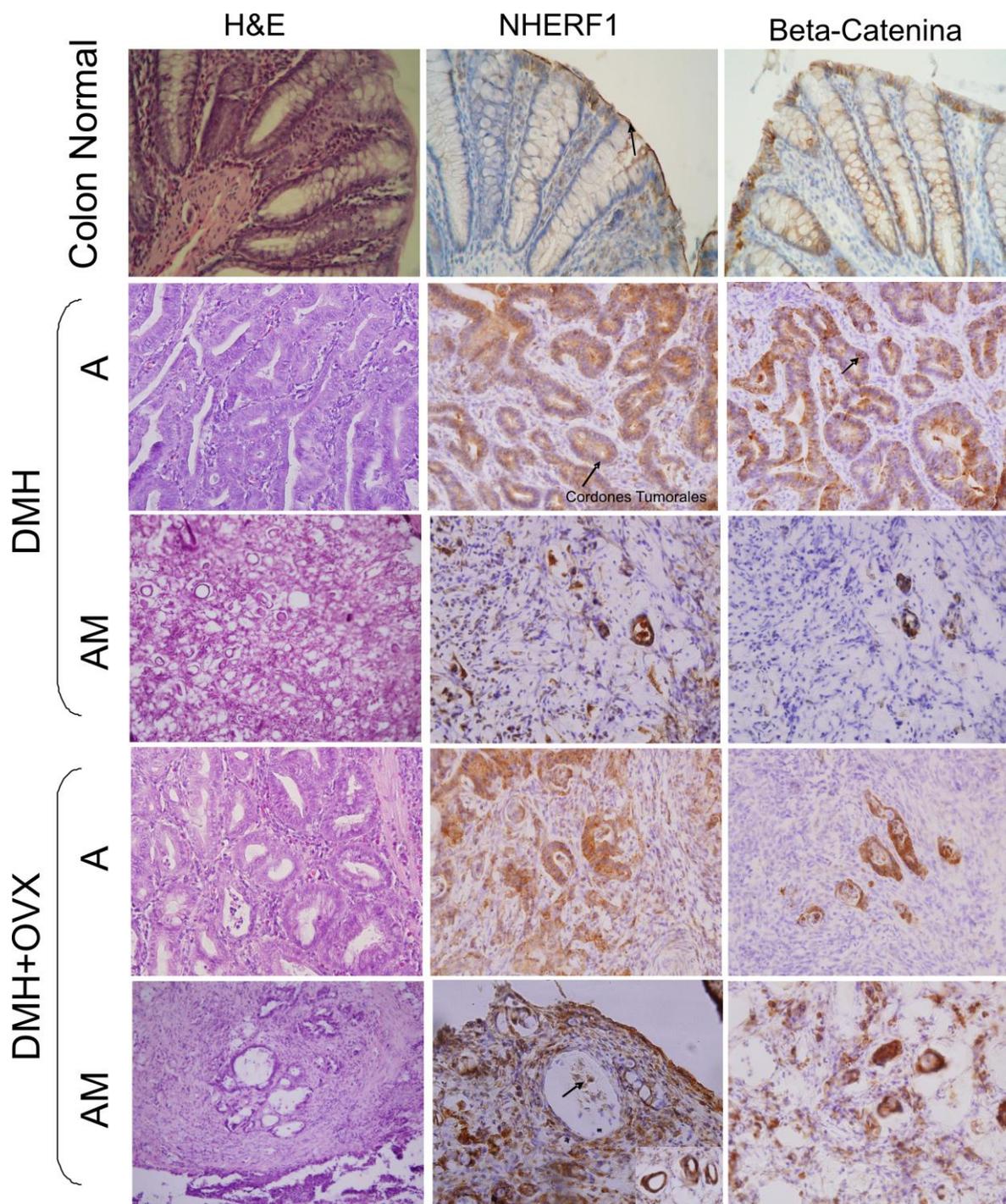


Figura 3: Estudio inmunohistoquímico de la proteína NHERF1 y β -catenina realizado en muestras de tejido del colon normal y carcinoma de colon en rata. Los paneles DMH y DMH+OVX corresponden a los tumores de colon obtenidos por la inducción con 1,2 dimetil-hidracina (DMH) y al grupo ovariectomizado (DMH+OVX), donde se observó el desarrollo de adenocarcinomas moderadamente diferenciados (A) y adenocarcinomas de tipo mucinoso (AM). Las flechas indican la expresión de NHERF1 en ambos tipos de tumores. Magnificación 400X y 600X (inserto, panel inferior).

CAPITULO IV

Discusión y conclusiones

IV.I. Discusión y conclusiones

El cáncer de colon esporádico es una enfermedad que tiene gran correlación con los hábitos de vida, como se ha descrito en varias ocasiones a través de estudios epidemiológicos y experimentales. Comúnmente las personas con mayor riesgo de contraer esta enfermedad son los hombres, pero también se ha visto que el riesgo aumenta en mujeres menopáusicas (Marino y Galluzzo, 2008). Estudios epidemiológicos han revelado un aumento en la incidencia de cáncer de mama y una reducción en el cáncer de colon del 40% en aquellas mujeres menopáusicas que decidieron tomar una terapia de reemplazo hormonal (Heiss G y col., 2008). Estudios experimentales llevados a cabo con el carcinógeno dimetilhidracina en ratas indicaron un mayor riesgo de contraer cáncer de colon en ratas machos que en hembras (Di Leo y col., 2001). Además, se sabe por estudios previos que el receptor de estrógenos expresado mayoritariamente en el colon es RE β (Campbell – Tomsom y col., 2001; Qiu y col., 2002; Xie y col., 2004; Cho y col., 2007), y cumple un rol antiproliferativo impidiendo el paso de G1 a S en el ciclo celular. Una alteración o disfunción del RE β podría ser uno de los mecanismos relacionados con el riesgo de contraer cáncer de colon y algunos autores postulan que este receptor se perdería en el tejido canceroso según se observó a nivel proteico y de ARNm (Slattery y col., 2005, Qiu y col., 2002, Wada-Hiraike y col., 2006, Foley EF y col., 2000, Campbell-Thompson M y col., 2001).

En este trabajo se observó que las ratas que fueron ovariectomizadas a mitad del tratamiento con el fin de quitarles el aporte plasmático de estrógenos, mostraron una tendencia a desarrollar un mayor número de tumores que las ratas tratadas únicamente con el carcinógeno 1,2-dimetilhidracina (DMH), pero esta diferencia no dio un valor estadísticamente significativo. Contrariamente sí se hallaron diferencias significativas en los promedios de las áreas tumorales de cada grupo experimental (DMH y DMH + OVX), siendo mayor el promedio del área tumoral para las ratas tratadas con DMH+OVX. Por lo tanto estos resultados permiten concluir que el estrógeno tiene efecto protector en el cáncer de colon.

En este contexto, se estudió la expresión de la proteína NHERF1, una proteína adaptadora de membrana expresada mayoritariamente en epitelios polarizados (Saotome y col., 2004) que en colon normal es regulada por los niveles plasmáticos de estrógenos (Cuello Carrión y col., 2010). En estudios previos se vió la importancia de NHERF1 en relación al mantenimiento de la ultraestructura del epitelio intestinal (Morales y col., 2004) y el rol que cumple como gen tumor supresor ya que estabiliza la unión de β -catenina/E-cadherina en la membrana plasmática ayudando a mantener la integridad de los tejidos epiteliales (Kreimann y col., 2007).

La importancia de NHERF1 en la iniciación y progresión del cáncer ha comenzado recientemente a ser estudiado y su rol es controversial. Se ha visto que dependiendo del sistema celular, puede actuar como un oncogén o gen supresor tumoral. Así se ha reportado la sobreexpresión de NHERF1 en cáncer de mama, sarcoma y cáncer hepatocelular (Shibata y col., 2003). En contraste, otros estudios han mostrado una pérdida frecuente de heterocigocidad para el locus del gen NHERF1 (17q 25.1) en 50% de los cánceres mamarios (Pan y col., 2006) y también mutaciones del gen en una frecuencia baja (3%), asociado esto a un aumento en la agresividad (Dai y col., 2004).

Los resultados obtenidos en este trabajo, siguen posicionando a NHERF1 en un rol controversial, ya que contrario a lo que se esperaba, hubo expresión de la proteína en el citoplasma de células tumorales de ratas tratadas con el carcinógeno DMH y ovariectomizadas y además hubo cambio en la localización subcelular de ambos grupos experimentales. Estos resultados indican que la expresión de la proteína NHERF1 en el tejido transformado sería independiente de la función ovárica y podría ser regulada por otros factores presentes en el tumor. Esto abre un abanico de alternativas para investigar la regulación de NHERF1 durante el proceso de transformación tumoral en el cáncer de colon.

Referencias bibliográficas

Acconcia F., Totta P., Ogawa S., Cardillo I., Inoue S., Leone S., Trentalance A., Muramatsu M., Marino M. (2005). Survival versus apoptotic 17 β -estradiol effect: role of ER α and ER β activated non-genomic signaling. *J. Cell. Physiol.*; 203: 193-201.

Bardin A., Boulle N., Lazennec G., Vignon F., Pujol P. (2004) Loss of ER β expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocrine-Related Cancer.*; 11: 537-551.

Bretscher, A., Chambers, D., Nguyen, R., Reczek, D. (2000). ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*; 16:113-143.

Campbell-Thompson M., Lynch IJ., Bhardwaj B. (2001). Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res.*; 15: 632-640.

Campo, E., Miguel R. (1990). Anatomía patológica. En: Grau JJ., Piqué JM. (eds.). *Monografías clínicas en oncología. Cancer colorrectal*. Barcelona. Edic. Doyma; 63-76.

Chlebowski RT., Wactawski-Wende J., Ritenbaugh C. (2004). Women's Health Initiative Investigators. Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.*; 350(10):991-1004.

Cho NL., Javid SH., Carothers AM., Redston M., Bertagnolli MM. (2007). Estrogen receptors alpha and beta are inhibitory modifiers of Apc-dependent tumorigenesis in the proximal colon of Min/+ mice. *Cancer Res.*; 67: 2366-2372.

Cuello-Carrión FD., Troncoso M., Guiñazu E., Valdez SR., Fanelli MA., Ciocca DR., Kreimann EL. (2010). Estrogens regulate the expression of NHERF1 in normal colon during the reproductive cycle of Wistar rats. *Histochem Cell Biol Histochemistry and Cell Biology*; 134 (6): 623-630.

Dai JL., Wang L., Sahin AA., Broemeling LD., Schutte M., Pan Y. (2004). NHERF (Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor) gene mutations in human breast cancer. *Oncogene*, 23:8681-8687.

Di Leo A., Messa C., Cavallini A., Linsalata M.(2001). Estrogens and colorectal cancer. *Curr Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.*; 1(1):1-12.

Fanelli MA, Cuello Carrión FD, Dekker J, Schoemaker J, Ciocca DR (1998). Serological detection of heat shock protein hsp27 in normal and breast cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; 7:791-795.

Foley EF., Jazaeri AA., Shupnik MA., Jazaeri O., Rice LW. (2000). Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res.*; 60(2):245-8.

Geneser, F. (2005). Aparato digestivo. En: Geneser, F. (Ed). *Histología. Sobre bases biomoleculares*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Giles, RH., Van Es, JH., Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*; 1653: 1-24.

Hao XP., Pretlow TG., Rao JS., Pretlow TP. (2001). β - Catenin Expression is altered in human colonic aberrant crypt foci. *Cancer Research*; 61:8085-8088.

Heiss G., Wallace R, Anderson GL; et al. (2008). Health Risks and Benefits 3 Years After Stopping Randomized Treatment With Estrogen and Progestin. *JAMA*; 299(9):1036-1045.

Johnson LR., McCormack SA. (1994). Regulation of gastrointestinal mucosal growth. En: Johnson LR.(Ed.): *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York, pp. 611-641.

Katzenellenbogen BS., Choi ID., Delage-Mourroux R., Ediger TR., Martini PG., Montano M., Sun J., Weis K., Katzenellenbogen JA.. (2000). Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol.*; 74(5): 279-85.

Konstantinopoulos PA., Kominea A., Vандoros G., Sykiotis GP., Andricopoulos P., Varakis I., Sotiropoulou-Bonikou G., Papavassiliou AG. (2003). Oestrogen receptor beta (ER β) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *European Journal of Cancer*; 39 (9):1251-1258

Kreimann EL., Morales FC., De Orbeta-Cruz J., Takahashi Y., Adams H., Liu TJ., McCrea PD., Georgescu MM. (2007). Cortical stabilization of Beta-catenin contributes to NHERF1/EBP50 tumor suppressor function. *Oncogene*; 26 (36): 5290-5299.

Kritchovsky, D. (1993). Colorectal cancer: the role of dietary fat and caloric restriction. *Mutat. Res.*; 290: 63-70.

Levin ER. (2005). Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*; 19: 1951-1959.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser CA., Krieger M., Scott M., Zipursky SL., Darnell J. (2005). *Cáncer*. En: Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser CA., Krieger M., Scott M., Zipursky SL., Darnell J (Ed.) *Biología celular y molecular*, 5ta ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Marino M., Galluzo P. (2008). Estrogen receptor β mediates the protective effects of estrogen in colon cancer. *Cancer Ther.*; 6: 149–162.

Marino M., Acconcia F., Trentalance A. (2003). Biphasic estradiol induced AKT-phosphorylation is modulated by PTEN via MAP kinase in HepG2 cells. *Mol. Biol. Cell.*; 14: 2583-2591.

Martineti V., Picariello L., Tognarini I., Carbonell Sala S., Gozzini A., Azzari C., Mavilia C., Tanini A., Falchetti A., Fiorelli G., Tonelli F., Brandi ML. (2005). ERbeta is a potent inhibitor of cell proliferation in the HCT8 human colon cancer cell line through regulation of cell cycle components. *Endocrine-Related Cancer*; 12(2):455-469

Maskens, AP. (1981). Confirmation of the two-step nature of chemical carcinogenesis in the rat colon adenocarcinoma model. *Cancer Res.*; 41: 1240-1245.

Morales, FC., Takahashi, Y., Kreimann, EL., Georgescu, MM. (2004). Ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50 organizes ERM proteins at the apical membrane of polarized epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 101: 17705-17710.

Nanda K., Bastian L., Hasseblad V., et al (1999). Hormone replacement therapy and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis. *Obstet. Gynecol.*; 95: 880-888.

Narayan S. y Roy D. (2003). Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol. Cancer*; 2: 41.

Nilsson S., Makela S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Ersson G., Enmark E., Pettersson K., Warner M., Gustafsson JÅ. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.*; 81: 1535-1565.

Pan Y., Wang L., Dai JL. (2006). Suppression of breast cancer cell growth by Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 (NHERF1), *Breast Cancer Res.*; 8(6): R63.

Piñols, FC. (1999). Estudio de los cambios en la mucosa colónica de rata y cinética celular durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-Dimetilhidracina. Alicante: Biblioteca Virtual Miguel de Cervantes; I S B N: 84-89727-64-3. Servei de Publicacions, Universitat de Lleida.

Podesta, E. (2008). La razón de las hormonas. El por qué de las glándulas endocrinas. Eudeba. Buenos Aires.

Qiu Y., Waters CE., Lewis AE., Langman MJ., Eggo, MC. (2002). Oestrogen-induced apoptosis in colonocytes expressing oestrogen receptor beta. *J. Endocrinol.*; 174: 369-377.

Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell.*; 50(4):649.

Ross JS. (1982). Experimental large intestinal adenocarcinoma induced by hydrazines and human colorectal cancer: a comparative study. In: Malt RA, Williamson RCN, eds. *Colonic Carcinogenesis*. MTP Press, Hingham; 187–207.

Rubio CA, Nylander G, Santos M. (1981). Further studies on the carcinogenesis of the colon cancer of the rat with special reference to the absence of intestinal contents. *Cancer*; 48(4):951–953.

Saotome I., Curto M., McClatchey AI. (2004). Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Dev Cell.*; 6:855-64.

Shibata T., Chuma M., Kokubu A., Sakamoto M., Hirohashi, S. (2003). EBP50, a beta-catenin-associating protein, enhances Wnt signaling and is over-expressed in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*; 38(1):178-86.

Slattery ML., Abd-Elghani N., Kerber R., Schumacher MC. (1990). Physical activity and colon cancer: a comparison of various indicators of physical activity to evaluate the association. *Epidemiology*; 1:481-485.

Slattery ML., Anderson K., Samowitz W., Edwards SL., Curtin K., et al. (1999). Hormone replacement therapy and improved survival among postmenopausal women diagnosed with colon cancer (USA). *Cancer Causes Control*; 10: 467-473.

Slattery ML., Sweeney C., Murtaugh M., Ma KN., Wolff RK., Potter JD., Caan BJ., Samowitz W. (2005). Associations between ER alpha, ER beta, and AR genotypes and colon and rectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; 14(12): 2936-2942.

Song J., Bai J., Yang W., Gabrielson EW., Chan DW., Zhang Z. (2007). Expression and clinicopathological significance of oestrogen-responsive ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 in breast cancer. *Histopathology*; 51: 40-53.

Statland BE. (1992). Nutrition and cancer. *Clin, Chem.*; 38:1587– 1594.

Stemmermann GN., Nomura AM., Chyou PH., Yoshizawa C. (1990). Prospective study of alcohol intake and large bowel cancer. *Dig. Dis. Sci.*; 35:1414-1420.

Su LK., Kinzler KW., Vogelstein B., Preisinger AC., Moser AR., Luongo C., Gould KA., Dove WF. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science*; 256(5057):668-70.

Voltz JW, Weinman EJ, Shenolikar S. (2001). Expanding the role of NHERF, a PDZ-domain containing protein adapter, to growth regulation. *Oncogene*; 20: 6309–6314.

Wada-Hiraike O., Imanov O., Hiraike H., Hultenby K., Schwend T., Omoto Y., Warner M., Gustafsson JA. (2006). Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103: 2959-2964.

Weinberg, R. (2007). *The Biology of Cancer*. Garland Science.

Weinman EJ., Steplock D., Tate K., Hall RA., Spurney RF., Shenolikar S. (1998). Structure-function of recombinant Na/H exchanger regulatory factor (NHE-RF). *J Clin Invest.*; 101(10):2199-206.

Weinman EJ. (2001). New functions for the NHERF family of proteins. *The Journal of Clinical Investigation*; 18:289-301.

Weyant MJ., Carothers AM., Mahmoud NN., Bradlow HL., Remotti H., Bilinski RT., Bertagnolli M M (2001). Reciprocal Expression of ERa and ERb Is Associated with Estrogen-mediated Modulation of Intestinal Tumorigenesis. *Cancer Research*; 61:2547–2551.

Xie LQ., Yu JP., Luo HS. (2004). Expression of estrogen receptor beta in human colorectal cancer. *World J Gastroenterol*; 10: 214-217.

Apéndice de tablas

Tabla A: Promedio de los pesos corporales semanales de ratas control y de las que recibieron el tratamiento con DMH y DMH+OVX

semanas	1	2	3	4	5	6	7
Control	149,6	179,25	208	223,4	240,2	255,4	259
DMH	144,88	178,94	203,24	216,94	233,59	247,12	251,65
DMH+OVX	142,6	174,8	196,3	209,6	222,3	238,6	243,2

semanas	8	9	10	11	12	13	14
Control	263	273,4	269,4	281,2	292,6	281	304,2
DMH	254,94	267,82	270,24	283,35	289,06	296,76	295,29
DMH+OVX	243,9	256,7	258	274,6	284,11	307	320,7

semanas	15	16	17	18	19	20	21
Control	301,4	311,2	312,2	319,4	318,4	319	327,2
DMH	300,18	303,65	310,59	310,12	318,29	314,35	317,29
DMH+OVX	331,4	345,5	346,7	348,5	344,6	353,9	359,1

semanas	22	23	24	25
Control	324	333	326,6	326,4
DMH	317,06	321,94	326,41	315,29
DMH+OVX	363,6	362,2	377,2	358,1

Tabla B: Número de tumores de colon por rata, en los grupos DMH y DMH+OVX.

N° de tumores de colon por Rata	DMH	DMH + OVX
	2	2
	1	3
	1	2
	2	2
	1	7
	1	4
	2	1
	3	2
	2	
	2	
	2	
	2	
Promedio	1,75±0.6216	2,875±1.885

Tabla C: Cálculo de las áreas tumorales

Tratamiento	Nº rata	Tumores /rata	semieje mayor (a) mm	semieje menor (b) mm	Area tumor (mm ²) A = $\pi \times a \times b$	Area tumoral/ rata (mm ²)	Area tumoral total (mm ²)
DMH No OVX	1	2	T1 a=4 T2 a= 1,5	T1 b=3,5 T2 b= 1	T1 A= 43,96 T2 A= 4,71	48,67	299,08
	2	2	T1 a= 1,5 T2 a= 2,5	T1 b= 1,25 T2 b= 2	T1 A= 5,88 T2 A= 15,7	21,58	
		3	T1 a= 3,5 T2 a= 2,5 T3 a=1,5	T1 b= 2,5 T2 b= 2 T3 b= 1	T1 A= 27,47 T2 A= 15,7 T3 A= 4,71	47,885	
	4	2	T1 a=2 T2 a= 4	T1 b= 2 T2 b= 3	T1 A= 12,56 T2 A= 37,68	50,24	
	5	2	T1 a=2,5 T2 a= 2	T1 b= 2 T2 b= 2	T1 A= 15,7 T2 A= 12,56	28,26	
	6	2	T1 a= 3,5 T2 a= 2,5	T21b= 2,5 T2 a= 1,75	T1 A= 27,47 T2 A= 13,73	41,21	
	7	2	T1a= 1,5 T2a= 1,25	T1b=1,5 T2b= 1	T1A= 7,065 T2A=3,925	10,99	
	8	1	T1a=1,5	T1b=1	T1A= 4,71	4,71	
	9	1	T1 a= 2	T1 b= 1,5	T1 A= 9,42	9,42	
	10	1	T1 a= 3	T1b= 2,5	T1A= 23,55	23,55	
	11	1	T1a =3,5	T1b= 3,5	T1A = 38,465	38,465	
	12	2	T1 a= 2 T2a= 2,5	T1 b= 1,75 T2b=1,5	T1 A= 10,99 T2A=11,775	22,765	
DMH + OVX	10	2	T1 a=5 T2 a= 3,5	T1 b=4,5 T2 b= 2,5	T1 A= 70,65 T2 A= 27,47	98,12	540,635
	11	7	T1 a= 1,25 T2 a= 2 T3 a= 2,5 T4 a=2,5 T5 a= 2 T6 a= 1 T7 a= 3	T1 b= 0,75 T2 b= 1,5 T3 b= 2 T4 b= 3 T5 b=1,5 T6 b= 0,5 T7 b=1,5	T1 A= 2,94 T2 A= 9,42 T3 A= 15,7 T4 A= 23,55 T5 A= 9,42 T6 A= 1,57 T7 A= 14,13	76,73	
	12	4	T1 a= 4 T2 a= 1,5 T3 a= 4 T4 a= 3	T1 b= 3 T2 b= 1 T3 b= 3 T4 b= 2	T1 A= 37,68 T2 A= 4,71 T3 A= 37,68 T4 A= 18,84	98,91	
	13	1	T1 a= 3,5	T1 b= 3	T1 A= 32,97	32,97	
	14	2	T1 a= 3,5 T2 a= 2	T1 b=2,5 T2 b= 1,5	T1 A= 27,47 T2 A= 9,42	36,89	
	15	2	T1 a= 2,5 T2 a= 5	T1 b= 1,5 T2 b= 3,5	T1 A= 11,77 T2 A= 54,95	66,72	
	16	3	T1 a= 2,5 T2 a= 3,5 T3 a= 0,5	T1 b= 2,5 T2 b= 3,5 T3 b= 0,5	T1 A= 19,62 T2 A= 38,46 T3 A= 0,78	58,86	
17	2	T1a=3,5 T2a=3,5	T1b=3 T2b=3,5	T1A= 32,97 T2A=38,465	71,435		

Tabla D: Distribución de tumores obtenidos en el tracto digestivo luego de la carcinogénesis química llevada a cabo en ratas con DMH y DMH + OVX.

	Tratamiento	
	DMH	DMH + OVX
Estómago	3 (13,6%)	0
Intestino Delgado	1 (4,5%)	4 (16,7%)
Colon/Recto	21 (84%)	23 (85,1%)
Total Tumores/Ratas	25/17	27/10

Tabla E: Distribución de tumores en los distintos sectores del colon, primer, segundo y tercer tercio, en ratas tratadas con DMH y DMH+OVX.

DMH+OVX			DMH		
1 ^{er} Tercio	2 ^{do} Tercio	3 ^{ro} Tercio	1 ^{er} Tercio	2 ^{do} Tercio	3 ^{ro} Tercio
7	11	5	7	7	6
30.4%	48%	21.7%	35%	35%	30%

