

*Revisión / Revision*

## UN MODELO EXPERIMENTAL INDUCIBLE EN RATÓN PARA CONDUCIR ESTUDIOS EN QUIMIOPREVENCIÓN Y ANTICARCINOGENESIS

AN INDUCIBLE EXPERIMENTAL MODEL IN MICE TO CONDUCT  
STUDIES IN CHEMOPREVENTION AND ANTICARCINOGENESIS

ENRIQUE ZAMORANO-PONCE\*, PAOLA LAGOS MUÑOZ, PILAR RIVERA CAAMAÑO  
Y JULIA FERNÁNDEZ ROMERO

\* Laboratorio de Genética Toxicológica (GENETOX), Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias,  
Universidad del Bío-Bío, ezamoran@ubiobio.cl

\* autor para correspondencia

### RESUMEN

Los modelos experimentales animales son una herramienta esencial en pruebas preclínicas que ensayan nuevas terapias *in vivo*. En esta revisión presentamos un diseño metodológico experimental en ratón confiable para estudios de quimiopreención y anticarcinogénesis. En primer término nos referimos a la inducción de lesiones preneoplásicas o Focos de Criptas Aberrantes (FCA) por azoxymetano (AOM) y proponemos un protocolo para la prevención de esta displasia colónica que ha sido aceptada en general como lesión precancerosa en vista de sus características histopatológicas y de sus alteraciones genéticas, epigenéticas, bioquímicas e inmunohistoquímicas. En segundo término, presentamos un protocolo para estudios de prevención de progresión de tumores esporádicos y de aquellos conducidos por inflamación inducida por Sulfato Sódico de Dextran (DSS). Se destaca la importancia de estas metodologías en estudios de quimiopreención y anticarcinogénesis mediante el uso de infusiones de plantas medicinales.

**Palabras claves:** Focos de criptas aberrantes, azoxymetano, cáncer de colon, antimutagénesis, anticarcinogénesis.

### ABSTRACT

Experimental animal models are essential tools for the preclinical testing of novel therapeutic *in vivo*. In this review we present two methodological designs to study chemoprevention and anticarcinogenesis. First we describe the use of the Azoxymethane (AOM)-induced preneoplastic lesions also known as Aberrant Crypt Foci (ACF) and we propose a protocol to study the prevention of the formation of this colonic dysplasia that has been generally accepted as precancerous lesions in view of its histopathological characteristic as well as its genetic, epigenetic, biochemical and immunohistochemical alterations. Second, we present a protocol to study chemoprevention of tumor progression in sporadic and inflammation-conducted tumor progression induced by Sodium Sulphate Dextran (DSS). The importance of these methodologies in studies of chemoprevention and anticarcinogenesis is the use of medicinal plants.

**Keywords:** Aberrant Crypt Foci, Azoxymethane, Colon Cancer, Antimutagenesis, Anticarcinogenesis.

Recepción: 17/04/08. Revisión: 12/04/08. Aprobación: 23/06/08.

## 1. DESARROLLO DEL CÁNCER COLORECTAL (CCR)

La carcinogénesis es un proceso de múltiples etapas en el desarrollo de neoplasmas malignos en el que se han identificado tres grandes estadios a saber: **iniciación**, **promoción** y **progresión**. La **iniciación** toma lugar a nivel del ADN, molécula en la cual los mutágenos introducen mutaciones y con ello se altera la regulación de la expresión de algunos genes importantes para la célula. Como resultado de ello, las células se adentran en un cambio irreversible caracterizado por una capacidad intrínseca de crecimiento autónomo potenciado. En la fase de **promoción** las células son estimuladas a dividirse y se hacen morfológicamente anormales. Esta fase potencia el desarrollo de neoplasmas clínica y patológicamente detectables. La **progresión** es la etapa mediante la cual la célula iniciada anormal experimenta nuevos cambios genéticos que terminan por conferirle fenotipo maligno lo que finalmente se traduce en el desarrollo de cáncer. Esta última etapa se ha subdividido en sub-etapas que caracterizan hitos en el desarrollo del cáncer tales como: angiogénesis o vascularización, desprendimiento, liberación, intravasación, supervivencia y extravasación. Durante la última década ha sido posible identificar al menos algunos de los eventos moleculares que subyacen a las etapas de iniciación, promoción y progresión. La gran mayoría de las neoplasias se inician por mutaciones o expresiones alteradas de algunos genes que cumplen funciones vitales en el control de procesos tales como: proliferación celular, apoptosis, reparación del ADN y envejecimiento celular. El desarrollo de una neoplasia en colon requiere al menos de cambios en tres tipos de genes celulares: proto-oncogenes (**PO**), genes supresores de tumores (**GST**) y genes de reparación de ADN. Algunos de los genes estudiados que cam-

bian su regulación en el proceso de carcinogénesis de colon se muestran en la Tabla I.

Se ha demostrado que durante el proceso de carcinogénesis de colon, intervienen factores genéticos (mutaciones) y epigenéticos; los **PO** son activados a oncogenes que promueven un crecimiento celular potenciado, ya que los productos codificados por proto-oncogenes ejercen efectos de control positivo sobre la proliferación celular y su mutación les confiere carácter dominante desde un punto de vista genético. A su vez, la inactivación de **GST** promueve igualmente un crecimiento potenciado debido a que los productos codificados por genes supresores de tumores ejercen una función reguladora negativa sobre los procesos de proliferación celular, lo que determina que su mutación en procesos tumorales les confiera un carácter recesivo. En tanto el CCR progresa en su desarrollo a través de estados muy bien definidos histológicamente, ha sido posible proponer algunos pasos en la adquisición de las alteraciones genéticas. Los cambios genéticos que conducen al CCR se inician con la inactivación de **APC** (Adenomatous Polyposis Coli o Poliposis Adenomatosa de Colon) un **GST** que puede ser el responsable de la transformación del epitelio colónico desde un estado normal a uno hiperproliferativo (Nishisho *et al.*, 1991). El producto de este gen mutado es una proteína de 300kDa truncada. Tras inactivarse **APC**, se observa la activación mutacional del **PO** llamado *K-ras* (Pretlow y Pretlow, 2005), tras lo cual se evidencia la inactivación del **GST** llamado **DCC** (Deleted in Colo-rectal Cancer o delecionado en el cáncer colorectal) ubicado en la región 18q22 y codifica una proteína de membrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas. El último evento de inactivación se detecta en **p53**, otro **GST**, el cual está aparentemente involucrado en el cambio del estado de adenoma al de carcinoma

**Tabla I.** Genes relacionados a la carcinogénesis colorectal y sus respectivas funciones.

<b>Gen</b>	<b>Función</b>
<b>oncogenes</b>	
K-Ras	Transducción de señales
CTNNB1	Adhesión celular y transducción de señales
SRC	Transducción de señales
Neu/her <sup>2</sup>	Receptor factor de crecimiento
MyC	Regulación ciclo celular
<b>Genes supresores de tumores</b>	
APC	Adhesión celular
p53	Regulación de ciclo celular (Detención en G <sub>1</sub> )
DCC	Adhesión celular
MCC	Transducción de señales
SMAD4	Transducción de señales
SMAD2	Transducción de señales
TGF_RII	Transducción de señales
Nm23H1	Inhibe metástasis
Nm23H2	Inhibe matástasis
<b>Genes de reparación</b>	
hMSH-2	Reparación de ADN
hMLH-1	Reparación de ADN
hPMS-1	Reparación de ADN
hPMS-2	Reparación de ADN
hMSH6	Reparación de ADN

Modificada de Catalán *et al.*, (2003) Rev. Med. Univ. Navarra 47(1) 15-19.

(de la Chapelle, 2004). Los genes de reparación de ADN contribuyen también al desarrollo de tumores de colon. Mutaciones en cualquiera de los genes de reparación señalados en la tabla I inducen a errores en la duplicación originando lo que se conoce como inestabilidad de microsatélites (Catalán *et al.*, 2003). Debe señalarse que el orden de los procesos de inactivación o activa-

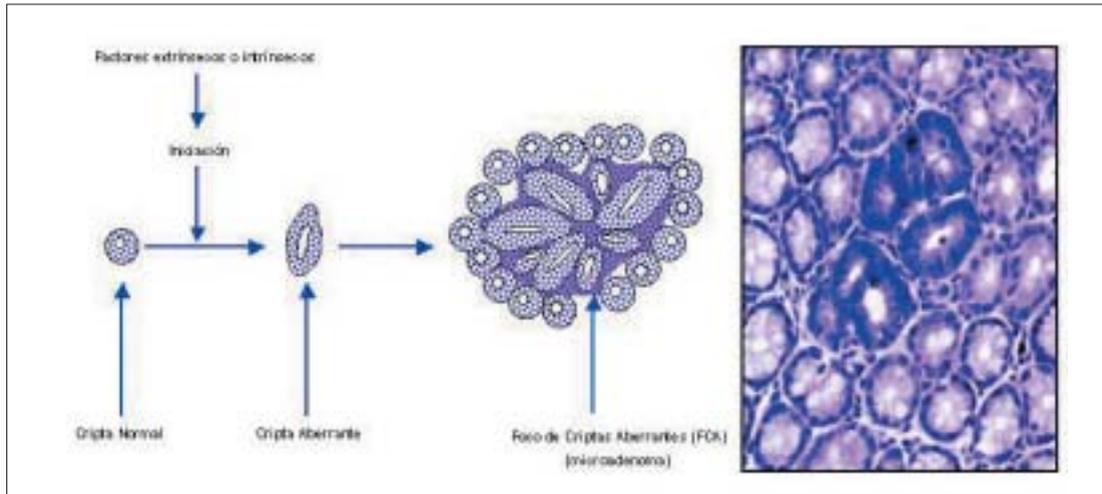
ción descritos, no es absoluto y la acumulación total de cambios es quizás más importante que su orden, en determinar el proceso carcinogénico. Después de todo, siendo el cáncer una enfermedad de muchas etapas, habrán algunos de éstas, en que la célula expresa características de célula normal y célula maligna.

## 2. FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES (FCA) COMO PRECURSORES DE CÁNCER COLO- RECTAL

Los intestinos grueso y delgado actúan como barreras importantes en contra de agentes exógenos particularmente sustancias con capacidad mutagénica y carcinogénica (Mori *et al.*, 2004). En la formación y desarrollo de lesiones preneoplásicas y neoplásicas en el colon y recto, existen factores etiológicos que se explican como resultado de procesos de biotransformación, activación o eliminación de compuestos químicos que se han ingerido por diferentes vías al organismo. La comprensión de los mecanismos de origen de estas lesiones preneoplásicas o precancerosas en el colon y recto es fundamental para entender la carcinogénesis colorectal y sus eventuales formas de prevención como se discutirá en el apartado 3. Los Focos de Criptas Aberrantes o simplemente FCA, fueron identificados inicialmente en colon de ratones tratados con azoxymetano (AOM) un carcinógeno específico de colon (Bird, 1987; Bird *et al.*, 1989). A cuatro años de su primera descripción en ratones Pretlow y colaboradores (1991) los describían en colon y recto de seres humanos. De esta forma, los FCA son considerados como lesiones preneoplásicas en ratones y en seres humanos, corresponden con lo que patólogos han diagnosticado preferentemente como hiperplasia focal y entre sus características distintivas pueden mencionarse las siguientes: 1) muestran un mayor tamaño que las criptas normales que los rodean, 2) poseen un espacio pericriptal más grande que los separa de las criptas normales y 3) a menudo poseen un epitelio engrosado que se tiñe más, 4) generalmente poseen aberturas ovales en vez de circulares como en el caso de las criptas normales. (McLelland y Bird, 1988) y 5) frecuentemente se observan al microscopio como elevaciones de la mucosa aunque a

veces también pueden observarse en depresiones de la misma, lo que se evidencia, ya que no se encuentran en el mismo plano focal que las criptas normales cuando se los observa bajo el microscopio. Para efectos de homogenización de criterios, se ha planteado que aquellas lesiones que muestran cuatro de esas cinco características pueden ser considerados por definición como FCA (Pretlow y Pretlow, 2005), (Fig. 1).

Para identificar los FCA generalmente se determina un protocolo de acuerdo a la naturaleza del estudio que se realiza. Por ejemplo en estudios en los que se desea evaluar cuantitativamente la presencia de FCA displásicos en mucosa de colon, en general se emplea la fijación en formalina al 10%. Si los FCA se procesan para inmuno-tinción, entonces la mucosa debe ser fijada de acuerdo con protocolos que preservan el antígeno de expresión. Si se desea extraer ADN o ARN a partir de los FCA entonces se emplea una fijación en etanol 70% por 30 minutos a 4°C (Bird *et al.*, 1997). Al teñir la mucosa con azul de metileno al 0.2% pueden visualizarse claramente los FCA, aunque la literatura muestra el uso de otras tinciones para la visualización de FCA (Bird, 1987; Pretlow *et al.*, 1991; Caderni *et al.*, 1995), la más empleada ha sido aquella que utiliza azul de metileno en análisis de mucosa de colon de ratón y rata montado *in toto*. En los últimos años se ha identificado algunos subtipos de FCA. Los denominados Focos de Criptas Aberrantes sin mucina (FCAsm) (del inglés: Mucin Depleted Foci). Se trata de criptas en las cuales la producción de mucina es baja o inexistente (Caderni *et al.*, 2003). Los FCAsm se los puede identificar muy fácilmente con coloraciones específicas para mucina como la tinción de Hierro Diamina-Azul Alcían (HID-AB del inglés High Iron Diamine Alcian Blue). Se ha evidenciado que este tipo de criptas aumentan su frecuencia de formación en ratones tratados con algunos agentes carcinógenos hepáticos tales



**Figura 1.** Mecanismo de formación de focos de criptas aberrantes en colon: Factores extrínsecos, entre los que se puede mencionar agentes químicos a los cuales se expone el individuo de diversa forma (hábitos, estilo de vida, dieta, ocupación, accidentalmente etc., e intrínsecos, es decir, propios del metabolismo celular, como pueden ser especies oxígeno-reactivas, dañan el ADN de las células e inducen la aparición de mutaciones que conllevan a la formación de criptas aberrantes, de histomorfología diferenciable de las criptas normales. La etapa de proliferación continúa, generándose un foco de criptas aberrantes o microadenoma (lesión preneoplásica). La imagen en la figura ha sido tomada desde Redston M (2001), USA & Canadian Academy of Pathology (3), 236-245.

como el ácido cólico (Femia *et al.*, 2004) y disminuyen en la multiplicidad de criptas así como en incidencia ante la presencia de agentes quimiopreventivos tales como el piroxicam y sinbióticos (Caderni *et al.*, 2003; Femia *et al.*, 2004).

### 3. PROTOCOLO DE INDUCCIÓN Y DE PREVENCIÓN DE FCA EN COLON DE RATONES

Para el biólogo experimental los focos de criptas aberrantes FCA pueden ofrecer la oportunidad de observar las alteraciones moleculares más tempranas que conducen al cáncer colorectal (CCR) (Stevens *et al.*, 2007). El CCR, un tumor maligno frecuente y la tercera causa de muerte en Chile después del cáncer gástrico y biliar (Medina y Kaempffer, 2001), se desarrolla espontánea-

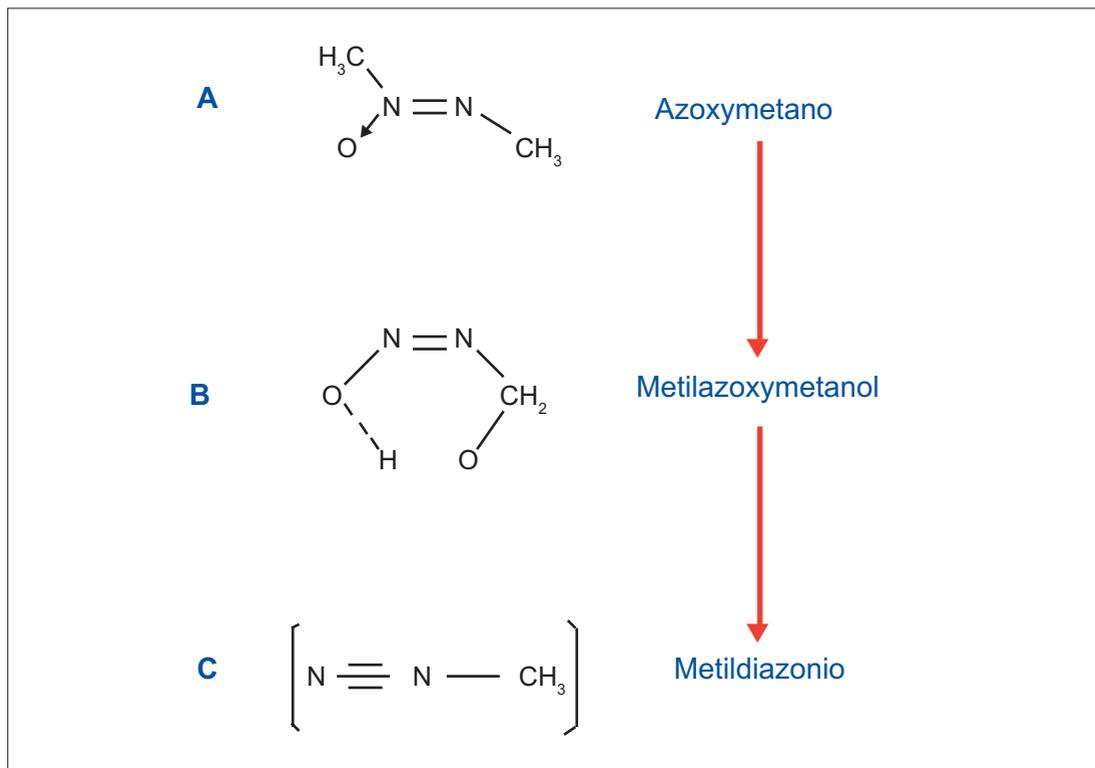
mente o por complicaciones a largo plazo de inflamaciones crónicas del intestino grueso como ocurre en la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. El riesgo de CCR es influenciado por predisposición genética que es elevada especialmente en el caso de las mutaciones somáticas del gen APC supresor de tumores (del inglés Adenomatosis Poliposis Coli o Poliposis Adenomatosa de Colon), causante de la adenomatosis de colon familiar (Powell *et al.*, 1993). Los modelos experimentales en animales se constituyen en una herramienta excepcional en el estudio de inducción/prevencción de FCA (y FCAsm) y de procesos tumorales. Los FCA son evidencia de cambios en la mucosa colónica inducidos por mutaciones de las células epiteliales troncales multipotenciales, ubicadas en la base de la cripta (Radtke y Clevers, 2005; Wirtz *et al.*, 2007; Humphries y Wright, 2008), que muestran fenómenos

divisionales peculiares descritos recientemente para la mantención de la sucesión clonal y establecidas en “nichos”, esto es, lugares anatómicos específicos que regulan cómo ellas participan en la generación del tejido, su mantención y reparación (Scadden, 2006). Se acepta hoy, sin una gran cantidad de evidencias, que el cáncer es una enfermedad de las células troncales. Las razones que se esgrimen para ello son, primero, que estas células poseen toda la maquinaria para la producción de múltiples generaciones de células antes de ser objeto de eventos genéticos de naturaleza oncogénica. Además, y esto es especialmente válido para sistemas en renovación permanente, como el epitelio intestinal, las células troncales son las únicas que persisten un tiempo suficiente en el tejido para llevar a cabo la larga secuencia de mutaciones sucesivas y de selección que demanda el concepto de carcinogénesis en múltiples etapas (Humpries y Wright., 2008).

Los FCA, decíamos corresponden a lesiones preneoplásicas y son de extrema utilidad para realizar experimentos con factores ambientales que permiten estimar la etiología, el tratamiento y la prevención del cáncer de colon (Montenegro *et al.*, 2003). Los modelos experimentales en roedores pueden imitar con un elevado nivel de significación muchos de los rasgos principales del CCR humano (Corpet y Pierre, 2005). El azoxymetano (AOM) y sus derivados son los agentes químicos más estudiados en la inducción específica de carcinogénesis colorectal. La mayoría de los modelos consignan el uso de ratas, aunque también se han desarrollado protocolos para el estudio de progresión tumoral esporádica o inducida por inflamación en ratones. El AOM es un agente químico que puede iniciar un cáncer por alquilación del ADN, facilitando un apareamiento erróneo de bases nitrogenadas (Papanikolaou *et al.*, 1998). Sin embargo el AOM no corresponde al metabolito carcinogénico final. Ne-

cesita activación metabólica después de la inyección intraperitoneal (ip). El proceso de activación no ha sido completamente esclarecido, aunque se sabe que requiere de hidroxilación, mediada por p450 hepática (Sohn *et al.*, 2001). Después de su excreción vía biliar, se promueve otro cambio químico estimulado por la presencia de la flora bacteriana intestinal antes de que pueda tener efecto colonotrópico (Fiala, 1977; Redi *et al.*, 1974), (Fig. 2).

Entre las ventajas que se han descrito y que argumentan a favor del uso de este modelo de inducción química de carcinogénesis, se pueden mencionar: potencia, reproducibilidad, simpleza y similitudes con la CCR humana como por ejemplo la ubicación de tumores que en ratón y humanos se concentra en la parte distal del colon. Muy frecuentemente ellos se desarrollan a partir de pólipos (crecimiento polipoide) y frecuentemente exhiben rasgos histopatológicos muy semejantes a los que se observan en CCR humano, con la diferencia que los tumores inducidos por AOM raramente muestran metástasis e invasividad de la mucosa (Boivin *et al.*, 2003; Nambiar *et al.*, 2003). También se han revelado semejanzas significativas entre el modelo de inducción química y el CCR humano en el nivel molecular. En ambos casos se observa expresión aberrante del gen APC (Fenoglio-Presier y Noffsinger, 1999) además de mutaciones y localización celular alterada de  $\beta$ -catenina (Takahashi *et al.*, 2000) y desregulación demostrada de algunas vías de señalización como es el caso del oncogén celular de mielocitomatosis (Guillem *et al.*, 1988), ciclina D1 y kinasas dependientes de ciclina (Wang *et al.*, 1998). Al igual que como se ha descrito en CCR humano, el sistema de inducción química también promueve un funcionamiento desregulado del proto-oncogén K-ras (Vivona *et al.*, 1993) y elevados niveles de óxido nítrico sintetasa y ciclooxigenasa-2 (Takahashi *et al.*,



**Figura 2.** Mecanismo de activación del Azoxyetano (AOM) (A) Tras inyectarse el Azoxyetano es transportado por vía sanguínea hasta el hígado donde es objeto de biotransformación que incluye al menos un paso de hidroxilación, llevado a cabo por citocromos del sistema P450. (B) El metilazoxymetanol formado, es excretado hacia el intestino por la bilis y una vez allí es objeto de un último proceso de transformación, realizado por factores aportados por la flora colónica, obteniéndose metildiazonio (C) que posee efecto colonotrópico. Modificado de Neufert *et al.*, 2007.

2000). Las lesiones pre-neoplásicas con varios grados de displasia<sup>1</sup> representan un paso obligatorio en la carcinogénesis de colon, cuya identificación y caracterización han centrado muchos esfuerzos en los últimos años (Chang, 1984; Bird, 1987; Paulsen *et*

<sup>1</sup> La **displasia** (del latín 'mala forma', malformación) es una anomalía también llamada **hiperplasia atípica** por alteración del desarrollo de las células epiteliales y mesenquimatosas, que han experimentado proliferación y alteraciones citológicas atípicas, que afectan a la orientación celular dentro de un epitelio, en el tamaño, forma y organización de las células. Esto puede ser el indicativo de un paso temprano hacia la transformación en una neoplasia, es por lo tanto un cambio pre-neoplásico o precanceroso.

*al.*, 2001). Efectivamente, debido a que la carcinogénesis de colon es un proceso largo que toma meses en desarrollarse en ratones, las lesiones preneoplásicas como los FCA que ocurren alrededor del día 30 después de la administración del carcinógeno o incluso antes, han sido usadas como referente de análisis en estudios de carcinogénesis y quimioprevención de corto plazo (Zheng *et al.*, 1999). Recientemente el grupo de Caderni, del Departamento de Farmacología de la Universidad de Florencia, en Italia, ha identificado un nuevo biomarcador de carcinogénesis de colon que corresponde a la presencia de focos aberrantes que carecen de

mucina. Estos focos aberrantes son fáciles de identificar y evaluar en colon entero no seccionado y muestran claras señales de displasia en los cortes histológicos. Este mismo grupo postula a los FCAsm con un bio-

marcador en la carcinogénesis de colon (Caderni *et al.*, 2003).

Bajo esas consideraciones la Figura 3 propone un protocolo para el estudio de formación de FCA bajo dos situaciones experimentales.



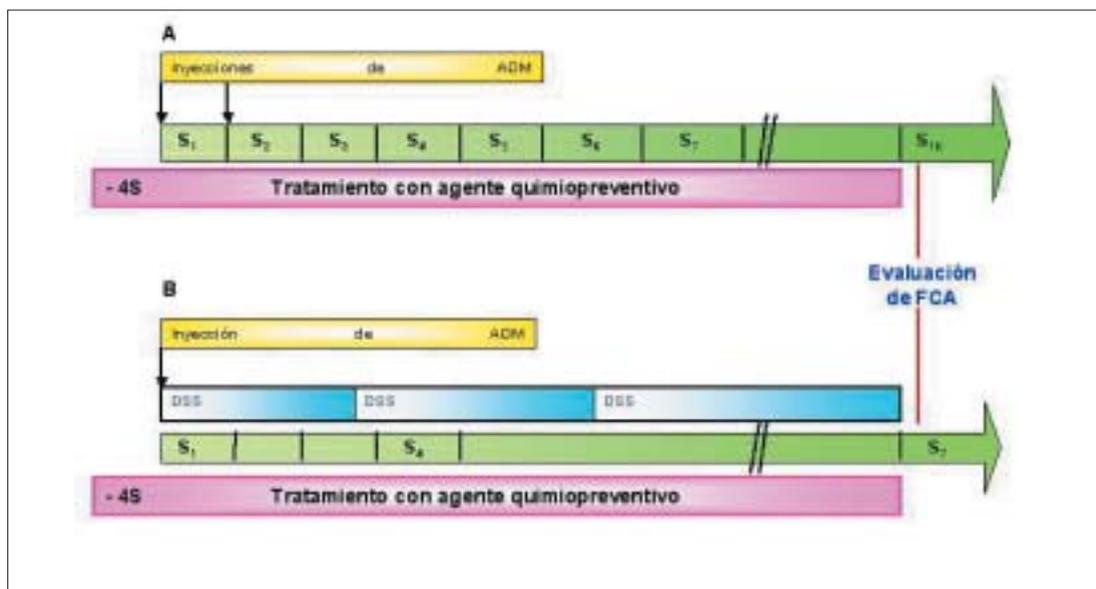
**Figura 3.** Esquema experimental para estudiar formación de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) inducidas por Azoxymetano (AOM) en colon de ratones. A) Sin inductor de inflamación. B) Con inducción de inflamación (DSS) S = Semana; DSS = Sulfato Sódico de Dextran.

La primera de ellas (3A) se fundamenta en la aplicación de dos inyecciones de AOM. La vía por la cual se administra el AOM debe ser siempre la misma, en nuestro protocolo proponemos la inyección intraperitoneal (i.p.) del agente y una evaluación de FCA en la semana 10 después de la primera aplicación. Dependiendo de la susceptibilidad de la cepa de ratones empleadas al AOM, se decidirá una concentración de entre 7 a 15 mg/kg. Si la cepa es susceptible, puede usarse una concentración de AOM de -por ejemplo- 7,5 mg/kg. Si la cepa de ratones empleadas en el estudio es de baja susceptibilidad, la concentración empleada del agente

químico debe estar más cercana a los 15 mg/kg. y en algunos casos quizás sea indicado utilizar el protocolo descrito en B. En términos generales se sugiere la inyección i.p. de AOM a una concentración de 10 mg/kg que se ha considerado como una concentración estándar que es muy bien tolerada por la mayor parte de la cepas incluyendo aquellas altamente susceptibles (Neufert *et al.*, 2007). La segunda alternativa (3B) involucra una sola inyección de AOM y un tratamiento de tres ciclos con DSS, que promueve la inflamación de la mucosa colónica. Como se puede ver en la figura, la evaluación de FCA puede realizarse en la semana

7 después de la inyección i.p. de AOM. El investigador podrá optar por uno de los dos protocolos (A o B) dependiendo de las características, objetivos de su estudio y la susceptibilidad de los animales de experimentación empleados en el mismo.

En relación con la prevención en la formación de FCA, la Figura 4 presenta una propuesta de diseño con dos alternativas opcionales.



**Figura 4.** Diseño experimental para estudios de quimioprevención en la formación de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) inducidos por Azoxyetano (AOM) en colon de ratones. A) Sin inductor de inflamación. B) Con inductor de inflamación de mucosa S = Semana; DSS = Sulfato Sódico de Dextran.

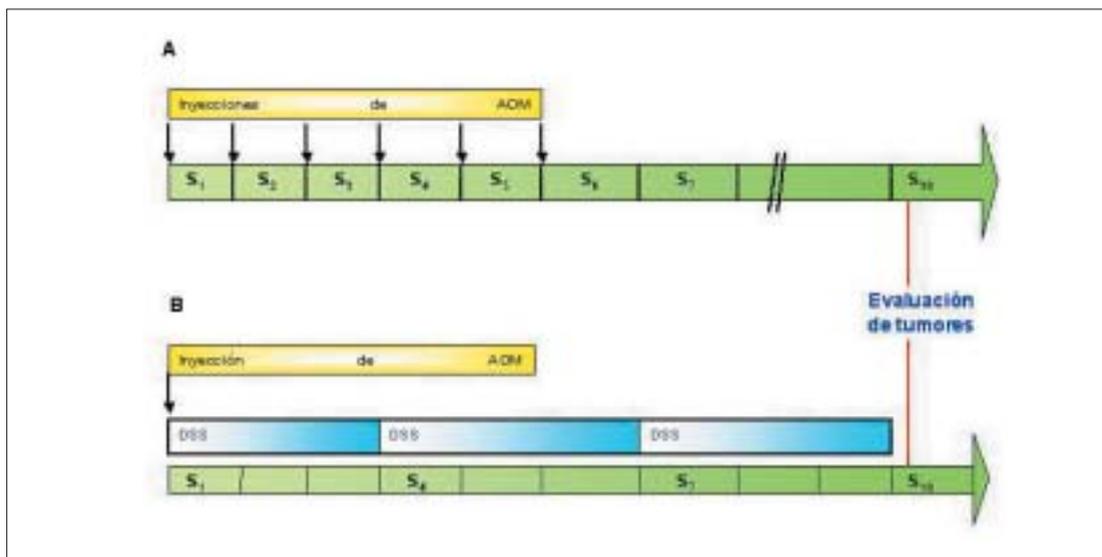
En 4A se presenta un diseño sin el empleo de DSS y en el que se trata a los animales con el agente químico preventivo a estudiar cuatro semanas previas a la primera inyección con AOM. Este tiempo de tratamiento previo para el caso del uso de infusiones de plantas medicinales como agente quimiopreventivo, se basa en evidencias que dan cuenta de la eficiencia en la prevención de daño inducido por agentes químicos como cisplatino o acrilamida por infusos de hierbas medicinales (Zamorano-Ponce *et al.*, 2004, 2006). El tratamiento se propone mantenerlo a término, esto es, hasta la se-

mana 10 en que se evalúa la frecuencia de FCA o la multiplicidad de éstas. En 4B se muestra el protocolo en el igualmente se inicia un tratamiento con el agente químico preventivo durante 4 semanas previas a la única inyección i.p. con AOM. En este caso se aplica un tratamiento con dextran (1-3%) en el agua de beber y los FCA se analizan a la séptima semana después de la inyección con AOM. El tratamiento con el agente preventivo se realiza a término es decir hasta la semana 7, en que se analiza la frecuencia o multiplicidad de FCA en el colon de los animales en experimentación.

#### 4. PROTOCOLO DE INDUCCIÓN Y PREVENCIÓN DE TUMORES EN COLON DE RATONES

Recientemente se han publicado algunos trabajos en los que se proponen protocolos experimentales concretos, con el fin de armonizar de alguna forma lo que se realiza en diferentes laboratorios y de esa forma poder realizar comparaciones válidas entre ellos. Como muestra la Figura 5, el diseño comprende dos opciones alternativas. La primera comprende inyecciones repetidas de AOM y es útil especialmente en el estudio de los factores que conducen la progresión espontánea del tumor. La segunda alternativa comprende el uso de sulfato sódico de dextran, un agente químico que promueve la inflamación y es especialmente útil en modelos de estudio en el que se aborda la progresión tumoral asociado a colitis crónica, como se observa en la colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn (Wirtz *et al.*, 2007). El modelo de dos alternativas que proponemos en

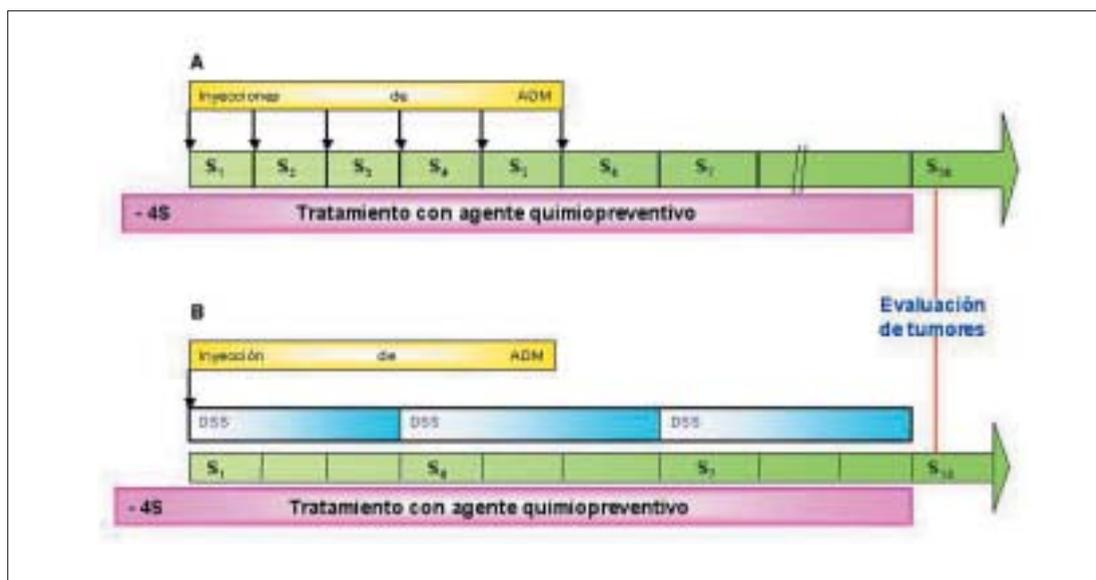
esta revisión es altamente eficiente en inducir tumores de colon en ratones y se basa en 6 inyecciones intraperitoneales de AOM y el análisis de tumores en la semana 30 tras la primera aplicación del agente (AOM). Algunos datos sugieren que cuatro inyecciones son suficientes para inducir un elevado grado de tumores (>90%) en cepas de susceptibilidad elevada. Balb-C la cepa empleada en nuestros experimentos, ha sido descrita como una cepa de baja sensibilidad a la inducción de tumores, de tal forma que proponemos 6 inyecciones con AOM y evaluación de éstos (número y tamaño) en la semana 30 después de la primera inyección con AOM. El tratamiento con una única inyección previa de AOM seguida con tres ciclos de DSS (5B), causa colitis crónica, la que ocasiona un crecimiento acelerado de tumores en relación al protocolo sin DSS, resultando en tumores grandes en la semana 10 después de la única inyección de AOM.



**Figura 5.** Esquema experimental para estudiar carcinogénesis inducida por Azoxyetano (AOM) en colon de ratones. A) Progresión de tumores inducidos por AOM B) Progresión de tumores potenciado por procesos de inflamación de mucosa mediante dextran S = Semana; DSS = Sulfato Sódico de Dextran. Modificado a partir de Neufert *et al.*, (2007), Nature Protocols 2 (8), 1998-2004.

En la Figura 6 presentamos protocolos de prevención de carcinogénesis con dos opciones alternativas de acuerdo a la naturaleza del estudio que se realiza. En este caso, proponemos igualmente un tratamiento cuatro semanas antes de la primera inyección de AOM con el agente anticarcinogénico putativo. El tratamiento se propone a término, es decir, hasta la semana 30, momento en el que se debe evaluar los tumores

en el colon de los animales de experimentación (6A). A su vez se formula un diseño opcional en el que se mantiene a los ratones durante cuatro semanas en tratamiento continuo a término con el agente preventivo, al igual que en 6A se aplica una inyección con AOM y adicionalmente en este modelo se aplica DSS en tres ciclos y se analiza la progresión tumoral a la semana 10 tras la aplicación de AOM (6B).



**Figura 6.** Diseño experimental para estudios de quimioprevención y anticarcinogénesis inducida por Azoxy-metano (AOM) en colon de ratones. A) Progresión espontánea de tumor sin inductor de inflamación de mucosa. B) Progresión conducida por procesos de inflamación de mucosa S = Semana; DSS = Sulfato Sódico de Dextran. Adaptado desde Neufert *et al.* (2007), Nature Vol. 2 (8), 1998-2004.

#### 4. QUIMIOPREVENCIÓN Y ANTICARCINOGENESIS

La quimioprevención fue originalmente definida por Sporn en el año 1976 (Fiala, 1977) para indicar: “la potenciación farmacológica o fisiológica mediante las cuales la progresión de una lesión preneoplásica puede ser prevenida, detenida o revertida”. Muchos estudios epidemiológicos y experimentales

sugieren una estrecha relación entre el riesgo de cáncer de colon y factores dietarios (una buena revisión el lector puede encontrarla en Norat y Riboli, 2003). Aunque muchos constituyentes en los alimentos y dietéticos se han asociado a una disminución en el riesgo de cáncer de colon, la evidencia epidemiológica es quizás más fuerte en lo relativo al consumo de vegetales. Muchos constituyentes químicos vegetales o fitoquímicos han

sido asociados con propiedades protectoras. Las hierbas medicinales constituyen una fuente de muchos de esos compuestos químicos. Se ha publicado un gran número de trabajos en los cuales se evidencian diversas capacidades de las infusiones de estas hierbas para quimioprevenir la ocurrencia de efectos celulares cuando ellas son ensayadas en experimentos *in vitro* e *in vivo* (WCRE, 1997; Weisburger *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2007; Issa *et al.*, 2007; Hang Xiao *et al.*, 2008;). Los antioxidantes juegan un rol importante en la protección de las macromoléculas celulares del daño oxidativo. Muchos antioxidantes naturales han mostrado una relación inversa de riesgo en varios tipos de cáncer distintos, incluyendo cáncer de colon. En estudios recientes nuestro grupo ha demostrado que infusos de *Alloysia triphylla* (cedrón) y *Peumus boldus* Molina (boldo) poseen un efecto protector de daño genético. Hemos podido demostrar además que la aplicación de la infusión de Cedrón o Boldo, incrementa significativamente el estatus antioxidante del plasma de los ratones de experimentación evaluado mediante las técnicas de FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) y peroxidación lipídica (determinación de malondialdehído a 532 nm) (Zamorano-Ponce *et al.*, 2004; 2006).

Como se decía en párrafos previos, los FCA son conjuntos de 3 a 20 o más criptas adyacentes que comparten anomalías morfológicas cuando se examinan bajo un microscopio de disección previamente teñidas con azul de metileno (revisado en Bird, 1987; Fenoglio-Preiser y Noffsinger, 1999). Se ha demostrado que estas neoformaciones son inducidas por todos los carcinógenos hepáticos conocidos, en dependencia con la dosis dosis, su número puede ser regulado por moduladores de la carcinogénesis de colon y predice muy bien el desarrollo de cáncer en el ratón. Además, los rasgos mor-

fológicos y genotípicos de los FCA en colon de rata son similares a los presentes en colon humano (Fenoglio-Preiser y Noffsinger, 1999). Las criptas displásicas han sido descritas como lesiones tempranas en ratones tratados con carcinógenos y humanos en riesgo y su formación es considerada como un paso necesario en el desarrollo del cáncer. En este contexto y en el marco del presente trabajo los FCA pueden constituirse en un biomarcador interesante de evaluar en estudios de corto plazo en carcinogénesis, atendido que hoy se los considera universalmente como antecedente inmediato en la mayoría de los cánceres colorectales (Humpries y Wright, 2008). Las criptas pueden ser fácilmente contabilizadas en el colon completo no seccionado y de acuerdo con ello el FCA se ha hecho muy popular como biomarcador de corto plazo en carcinogénesis experimental y quimioprevención (Bird, 1987). En los últimos años se ha focalizado la atención en aquellos FCA que están constituidos por criptas con reducido o inexistente contenido en mucina (FCAsm) como un biomarcador más preciso de análisis. En los protocolos que se proponen en esta revisión se evalúa el número total de criptas aberrantes y de ellas deiferencias la subpoblación de FCAsm. Para esto último, se sugiere emplear la tinción (HIB-AB) (High Iron diamine-alcian blue) para evaluar la producción de mucina (Yamada *et al.*, 2000; Femia *et al.*, 2004).

## 5. CONCLUSIONES

Los protocolos experimentales inducibles que presentamos en esta revisión brindan una serie de posibilidades para el biólogo experimental. Por un lado, permiten avanzar en el estudio de los mecanismos de formación de focos de criptas aberrantes (FCA), lesiones pre-neoplásicas que se cree corres-

ponden a las primeras manifestaciones de procesos carcinogénicos posteriores. El protocolo permite además la posibilidad de examinar el efecto de agentes preventivos putativos que inhiban la formación de estas displasias colónicas y avanzar así dentro de posibilidades terapéuticas futuras. El FCA es especialmente válido como biomarcador de efecto para ensayar infusiones de hierbas medicinales a las cuales se les atribuyen propiedades preventivas y en las que se ha podido comprobar dicho efecto (Fukutake *et al.*, 2000; Patlolla *et al.*, 2006; Asano *et al.*, 2007; Bhattacharjee *et al.*, 2007; Issa *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2008). Por otra parte, proponemos –además– un protocolo para estudiar la progresión de tumores inducidos por AOM y explorar posibilidades de modulación del proceso, así como de prevención en la formación de neoplasias en colon.

Esperamos que esta revisión motive estudios posteriores que utilice este tipo de protocolos experimentales que auguran constituirse en uno de los ensayos que brindará información importante en torno a los mecanismos que subyacen al desarrollo del CCR.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus sinceros agradecimientos a la Dra. Lúcia R. Ribeiro, por facilitar el aprendizaje de la técnica de la Srta. Paola Lagos Muñoz a través de una estada de investigación, en la UNESP-Botucatu-Brasil; al Sr. Gerardo Quezada Silva, por su excelente colaboración técnica en los experimentos exploratorios que nuestro equipo está llevando a cabo en esta línea de investigación sobre FCA y análisis de progresión de tumores, y a DIUBB a través de los proyectos 012407-2 y 055109 3/R, a partir de los cuales nuestro grupo ha derivado en el cultivo de esta interesante línea de trabajo.

## 7. REFERENCIAS

- ASANO N, KUNO T, HIROSE Y, YAMADA Y, YOSHIDA K, TOMITA H, NAKAMURA Y and MORI H (2007) Preventive effects of a flavonoid myricitrin on the formation of azoxymethane-induced pre-malignant lesions in colon of rats *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **8**(1), 73-76.
- BIRD RP. (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* **37**, 147–151.
- BIRD RP, McLELLAN EA and BRUCE WR (1989) Aberrant crypts, putative precancerous lesions in the study of diet in the aetiology of colon cancer, *Cancer Surv.* **8**, 189-200.
- BIRD RP. (1995) Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.* **93**, 55-71.
- BIRD RP, SALO D, LASKO C and GOOD A. (1997) A novel methodological approach to study the level of specific protein and gene expression in aberrant crypt foci putative preneoplastic lesions by western blotting and RT-PCR. *Cancer Lett.* **116**, 15-19.
- BHATTACHARJEE S, RANA T and SENGUPTA A (2007) Inhibition of lipid peroxidation and enhancement of GST activity by Cardamom and Cinnamom during chemically induced colon carcinogenesis in Swiss Albino mice *Asian Pac. J. Cancer* (2007) **8**(4), 578-582.
- BOIVIN GP, WASHINGTON K, YANG K, WARD JM, PRETLOW TP, RUSSELL R, BESSELS DG, GODFREY VL, DOETSCHMAN T, DOVE WF, PITOT HC, HALBERG RB, ITZKOWITZ SH, GRODEN J and COFFEY RJ. (2003) Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology* **124**, 762–777.
- CADERNI G, GIANNINI A, LANCIONI L, LUCERI C, BIGGERI A and DOLARA P. (1995) Characterization of aberrant crypt foci in carcinogen-treated rats: association with intestinal carcinogens. *Br. J. Cancer*, **71** (4)763-769.

- CADERNI G, FEMIA AP, GIANNINI A, FAVUZZA A, LUCERI C, SALVADORI M and DOLARA P. (2003) Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. *Cancer Res.* **63**, 2388–2392.
- CATALÁN V, HONORATO B, GARCÍA F, BANDRÉS E, ZABALEGUI N, ZÁRATE R, SALGADO E y GARCÍA-FONCILLAS J. (2003) Carcinogénesis colónica: proceso de transformación. *Rev.Med.Univ. Navarra*, **47** (1), 15-19.
- CORPET DE and PIERRE F. (2005) How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans?. A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rat, mice and men. *Eur. J. Cancer*, **41**, 1911-1922.
- CHANG WWL (1984) Histogenesis of colon cancer in experimental animals. *Scand. J. Gastroenterol.*, **19**, 27–43.
- DE LA CHAPELLE A. (2004) Genetic predisposition to colorectal cancer *Nature Reviews / Cancer* **4**, 769-780.
- FEMIA PA, DOLARA P and CADERNI G. (2004) Mucin- depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis *Carcinogenesis* **25**(2) 277-281.
- FENOGLIO-PREISER CM and NOFFSINGER A. (1999) Review Article: Aberrant Crypt foci: A Review. *Toxicologic Pathology* **27**, (6), 632-642.
- FIALA ES. (1977) Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer* **40**, 2436–2445.
- FUKUTAKE M, MIURA N, YAMAMOTO M, FUKUDA K, IJIMA O, ISHIKAWA H, KUBO M, OKADA M, KOMATSU Y, SASAKI H, WAKABAYASHI K, ISHIGE A, AMAGAYA S. Suppressive effect of the herbal medicine Oren-gedoku-to on cyclooxygenase-2 activity and azoxymethane-induced aberrant crypt foci development in rats (2000) *Cancer Lett.* **157**(1),9-14.
- GUILLEM JG, HSIEH LL, O'TOOLE KM, FORDE KA, LOGERFO P, WEINSTEIN IB. (1988) Changes in expression of oncogenes and endogenous retroviral-like sequences during colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **48**, 3964–3971.
- HAO X, BOSE M, LAMBERT JD, JU J, LU G, LEE MJ, PARK S, HUSAIN A, WANG S, SUN Y, YANG CH S. (2007) Inhibition of Intestinal Tumorigenesis in *Apc*<sup>Min/+</sup> Mice by Green Tea Polyphenols (Polyphenon E) and Individual Catechins Nutrition and Cancer, **59**(1), 62-69.
- HUMPHRIES A and WRIGHT NA (2008) Colonic crypt organization and tumorigenesis *Nature Reviews Cancer* **8**, 415-424 (June 2008).
- ISSAAY, VOLATE SR, MUGA SJ, NITCHEVA D, SMITH T and WARGOVICH MJ. (2007). Green tea selectively targets initial stages of intestinal carcinogenesis in the AOM-Apc<sup>Min</sup> mouse model. *Carcinogenesis* **28** (9), 1978-1984.
- MaCLELLAN, EA and BIRD RP. (1988) Aberrant crypts: Potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res* **48**, 6187-6192.
- MONTENEGRO MA. SANCHEZ NEGRETE M, LÉRTORA WJ, CATUOGNO MS. (2003) Focos de criptas displásicas inducidas con 1,2-dimetilhidrazina en intestino grueso de ratas tratadas con Molibdeno y tungsteno. *Rev. Vet.*, **14**(19), 15-19.
- MEDINA E and KAEMPPFER A. (2001) Mortalidad por cáncer en Chile: consideraciones epidemiológicas. *Rev Méd Chile*; **129**, 1195-202.
- MORI H, YAMADAY, KUNO T and HIROSE Y. (2004) Aberrant crypt foci and  $\beta$ -catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal Carcinogénesis. *Mutation Research* **566**, 191-208.
- NAMBIAR PR, GIRNUNG, LILLO NA, GUDA K, WHITELEY HE, ROSENBERG DW. (2003) Preliminary analysis of azoxymethane induced colon tumors in inbred mice commonly used as transgenic/knockout progenitors. *Int. J. Oncol.* **22**, 145–150.
- NEUFERT C, BECKER C and NEURATH MF (2007) An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of spo-

- radic and inflammation-driven tumor progression. *Nature*, 2(8), 1998-2004.
- NISHISHO I, NAKAMURA Y, MIYOSHI Y. (1991) Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 253 (5020), 665-669.
- NORAT T and RIBOLI E (2003) Dairy products and colorectal cancer. A review of possible mechanisms and epidemiological evidence. *Eur. J. Clinical Nutrition*, 57, 1-17.
- PAPANIKOLAOU A, SHANK A, DELKER DA, POVEY A, COOPER DP and ROSENBERG DW. (1998) Initial level of azoxymethane-induced DNA methyl adducts are not predictive of tumor susceptibility in inbred mice *Toxicol. Apply Pharmacol* 150, 196-203.
- PATLOLLA JMR, RAJU J, SWAMY MV AND RAO C V. (2006)  $\beta$ -Escin inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats and regulates the cell cycle growth by inducing p21<sup>waf1/cip1</sup> in colon cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 5, 1459-1466.
- PAULSEN JE, STEFFENSEN IL, LOBERG EM, HUSOY T, NAMORK E. and ALEXANDER J. (2001) Qualitative and quantitative relationship between dysplastic aberrant crypt foci and tumorigenesis in the *Min/+* mouse colon. *Cancer Res.*, 61, 5010-5015.
- POWELL SM, PETERSEN G, CRUZ A, BROKER S, JEN J, GIARDIELLO FM, HAMILTON SR, VOGELSTEIN B, and KINZLER KW. (1993) Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med*, 329, 1982-1987.
- PRETLOW TP, BARROW BJ, ASHTON WS, O'RIORDAN MA, PRETLOW TG, JURSIČEK JA, STELLATO TA. (1991) Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa, *Cancer Res.* 51, 1564-1567.
- PRETLOW TP, O'RIORDAN MA, SPANCAKE KM, PRETLOW TG. (1993) Two types of putative preneoplastic lesions indentified by hexosaminidase activity in whole-mount of colon from F344 rats treated with carcinogen *Am. J. Pathol.*, 142, 1695-1700.
- PRETLOW TP and PRETLOW TG. (2005) Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): Initiation of colorectal cancer? *Biochemica et Biophysica Acta*, 1756, 83-96
- RADTKE F and CLEVERS H (2005) Self renewal and cancer of the gut: two sides of a coin *Science*, 307, 1904-1909.
- REDDY BS, WEISBURGER JH, NARISAWA T and WYNDER EL. (1974) Colon carcinogenesis in germ-free rats with 1,2-dimethylhydrazine and *N*-methyl-*n*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Cancer Res.* 34, 2368-2372.
- REDSTON M (2001) Carcinogenesis in the GI tract: From morphology to Genetics and Back Again. *The United States and Canadian Academy of Pathology* 14 (3), 236-245.
- ROSS SA, FINLEY J W and MILNER JA. (2006) Allyl Sulfur Compounds from Garlic Modulate Aberrant Crypt Formation *J. Nutr.* 136, 852S-854S.
- SCADDEN D (2006) The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441, 1075-1079.
- ROSS SA, FINLEY JW and MILNER JA (2006) Significance of Garlic and Its Constituents in Cancer and Cardiovascular Disease. *J. Nutr.* 136:852-854.
- SOHN OS, FIALA ES, REQUEIJO SP, WEISBURGER JH and GONZALEZ FJ. (2001) Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. *Cancer Res.* 61, 8435-8440.
- STEVENS RG, SWEDE H and ROSENBERG DW. (2007) Epidemiology of colonic aberrant crypt foci: Review and analysis of existing studies *Cancer Lett.* 252, 171-183.
- TAKAHASHI M, MUTOH M, KAWAMORI T, SUGIMURA T. and WAKABAYASHI K (2000) Altered expression of beta-catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 1319-1327.
- TAKAHASHI M, NAKATSUGIS, SUGIMURA T and WAKABAYASHI K. (2000) Frequent mutations of the beta-catenin gene in mouse colon tumors induced by azoxymethane. *Carcinogenesis* 21, 1117-1120.
- VIVONA AA, SHPITZ B, MEDLINE A,

- BRUCE WR, HAY K, WARD MA, STERN HS and GALLINGER S. (1993) K-ras mutations in aberrant crypt foci, adenomas and adenocarcinomas during azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **14**, 1777-1781.
- WANG QS, PAPANIKOLAOU A, SABOURIN CL and ROSENBERG DW. (1998) Altered expression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 in azoxymethane-induced mouse colon tumorigenesis. *Carcinogenesis* **19**, 2001-2006.
- WEISBURGER JH, RIVENSON A, REINHARDT J, ALIAGA C, BRALEY J, PITTMAN B and ZANG E (1998) Effect of black tea on azoxymethane-induced colon cancer. *Carcinogenesis*, **19**, 229-232.
- WIRTZ S, NEUFERT C, WEIGMANN B and NEURATH MF (2007) Chemically induced mouse model of intestinal inflammation. *Nature Protocols* **2**(3)541-546.
- WORLD CANCER RESEARCH FOUNDATION (1997) Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A global Perspective. American Institute for Cancer Research, Washington, DC, p. 670.
- XIAO H, HAO X, SIMI B, JU J, JIANG H, REDDY BS And YANG CH. (2008) Green tea polyphenols inhibit colorectal aberrant crypt foci (ACF) formation and prevent oncogenic changes in dysplastic ACF in azoxymethane-treated F344 rats. *Carcinogenesis* **29**(1):113-119.
- YAMADA, Y., N. YOSHIMI, Y. HOROSHE, K.KAWABATA, K.MATSUNAGA, M. SHIMIZU, A. HARA AND H. MORI (2000) Frequent B-catenin gene mutation and accumulation of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance in rat colon carcinogenesis *Cancer Res.*, **60**:3323-3327.
- ZAMORANO-PONCE E, FERNÁNDEZ J, VARGAS G, RIVERA CAAMAÑO P and CARBALLO MA. (2004) Protective activity of cedron (*Aloysia triphylla*) infusion over genetic damage induced by cisplatin evaluated by the comet assay technique *Toxicology Letters* **152** 85-90.
- ZAMORANO-PONCE E, MORALES C, RAMOS D, SEPÚLVEDA C, CARES S., RIVERA CAAMAÑO P, FERNÁNDEZ J, CARBALLO MA. (2006) Anti-genotoxic effect of *Aloysia triphylla* infusion against acrylamide-induced DNA damage as shown by the comet assay technique *Mutation Research* **603**, 145-150.
- ZHENG Y, KRAMER PM, LUBET RA, STEELE VE, KELOFF GJ and PEREIRA MA. (1999) Effect of retinoids on AOM-induced colon cancer in rats: modulation of cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci. *Carcinogenesis*, **20**, 255-260.