

ULTRAESTRUCTURA PERITUMORAL EN PACIENTES CON CÁNCER DE RECTO Y TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA Y RADIOTERAPIA

S. D. Sierra-Áñez^a, H. J. Finol^{a*}, A. Roschman-González^a, C. Sardiñas^b

^aCentro de Microscopía Electrónica, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

^bUnidad de Coproctología, Hospital Universitario, Universidad Central de Venezuela.

*Autor de correspondencia: Dr. Héctor J. Finol, apartado 40.494, Los Chaguaramos, Caracas 1041A, Venezuela. Tel. +58(212)6051619; email: hector.finol@gmail.com

Recibido: Octubre 2011. Aprobado: Febrero 2013.

Publicado: Mayo 2013

RESUMEN

Alteraciones ultraestructurales se observaron en células musculares lisas, nervios amielínicos y microvasculatura de áreas peritumorales del cáncer de recto en pacientes tratados y no tratados con quimioterapia y radioterapia. Las mismas fueron similares en ambas condiciones, observándose en las células musculares lisas una variación en el grado de severidad de los daños que incluyeron necrosis, en tanto que en la inervación amielínica se apreció disminución de neurofilamentos, microtúbulos y vesículas sinápticas así como una disposición irregular de los mencionados elementos del citoesqueleto. En la microvasculatura se observó un engrosamiento de la pared endotelial y membrana basal con reduplicación frecuente de esta última. Adicionalmente, disminuyó el número de cavéolas, vesículas pinocíticas, cuerpos densos y placas densas.

Palabras clave: ultraestructura peritumoral, cáncer de recto, quimioterapia, radioterapia.

PERITUMORAL ULTRASTRUCTURE IN PATIENTS WITH RECTAL CANCER TREATED WITH CHEMOTHERAPY AND RADIOTHERAPY

ABSTRACT

Ultrastructural alterations were seen in smooth muscle cells, nonmyelinated nerves and microvasculature in peritumoral areas of rectal cancer in patients treated and no treated with chemotherapy and radiotherapy. The alterations were similar in both conditions, being observed in smooth muscle cells a variable degree of severity of changes including necrosis. In nonmyelinated fibers it was appreciated a decrease of neurofilaments, microtubules and synaptic vesicles with an irregular disposition of mentioned components of cytoskeleton. In relation to microvasculature it was observed widening of endothelial wall and basement membrane often reduplicated. Additionally, there was a diminution of caveolae, pinocytic vesicles, dense bodies and plaques.

Keywords: peritumoral ultrastructure, rectal cancer, chemotherapy, radiotherapy

INTRODUCCIÓN

Los tejidos no invadidos que rodean al tumor primario son considerados como normales [1], aun cuando ello ha sido cuestionado por quienes han encontrado células genéticamente anormales rodeando a carcinomas de cuello y cabeza [2], así como alteraciones ultraestructurales provocadas por carcinomas gastrointestinales [3,4], carcinoma epidermoide [5,6] y adenocarcinoma de próstata [7]. Con el presente trabajo se intenta determinar si ocurre

remisión de las alteraciones peritumorales, luego del tratamiento con quimioterapia y radioterapia de pacientes con adenocarcinomas de recto. La descripción de tales alteraciones se efectuará en relación a las que ocurren en células musculares lisas, inervación amielínica y microvasculatura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo, se emplearon cinco [5] biopsias de recto provenientes de dos [2] pacientes femeninos y tres [3] masculinos, con edades comprendidas entre 40 y 70 años, diagnosticados con Adenocarcinoma (ADC) de recto medio y bajo en los estadios C y D, correspondientes a la clasificación de Dukes, modificada en 1974 por Gunderson y Sosin [8]. Estos pacientes fueron remitidos al Hospital Universitario de Caracas, recibiendo tratamientos de quimioterapia y radioterapia previos a la cirugía. Por su parte, los controles negativos utilizados para esta investigación, correspondieron a 4 biopsias de colon provenientes de pacientes de sexo masculino, con edades comprendidas entre 45 y 75 años, diagnosticados con ADC de colon en estadios C y D. En todos los casos se contó con el consentimiento informado de los pacientes.

La toma de las muestras se realizó en el momento en que los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente, siendo las mismas obtenidas a diferentes distancias peritumorales (1 a 4 cm a partir del borde del tumor). Inmediatamente de extraídas las muestras, se efectuó una prefijación con la solución de Karnovsky en buffer fosfato de Millonig a pH de 7,4 y 320 mOsm. Una vez en el laboratorio, se cortaron las muestras en trocitos de 2mm x 1mm y se continuó la fijación hasta completar la hora en la solución de Karnovsky. Luego, la postfijación se realizó en OsO₄ al 1% bajo las mismas condiciones de pH y osmolaridad. La deshidratación se efectuó en concentraciones crecientes de etanol, manteniéndose la temperatura en todo el proceso hasta el alcohol de 80° a 4°C. La infiltración se llevó a cabo en óxido de propileno a temperatura ambiente, seguida por la polimerización en resina EMBED-812 (EMS, Hatfield Pensilvania), en estufa a 60°C y durante 48 h. Los cortes (60-90 nm), se obtuvieron con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo Porter-Blum MT2-B y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. La observación se realizó en un microscopio electrónico de transmisión Jeol

JEM-1011 a un voltaje de aceleración de 80 kV. El registro permanente se hizo en negativos Kodak (No. 4489) de 8,3 X 10,2 cm. Cortes gruesos para el estudio histológico se colorearon con azul de toluidina al 1%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Alteraciones similares fueron observadas en pacientes tratados y no tratados con quimioterapia y radioterapia, en relación al tejido muscular liso, nervios amielínicos y microvasculatura, a diferentes distancias del tumor.

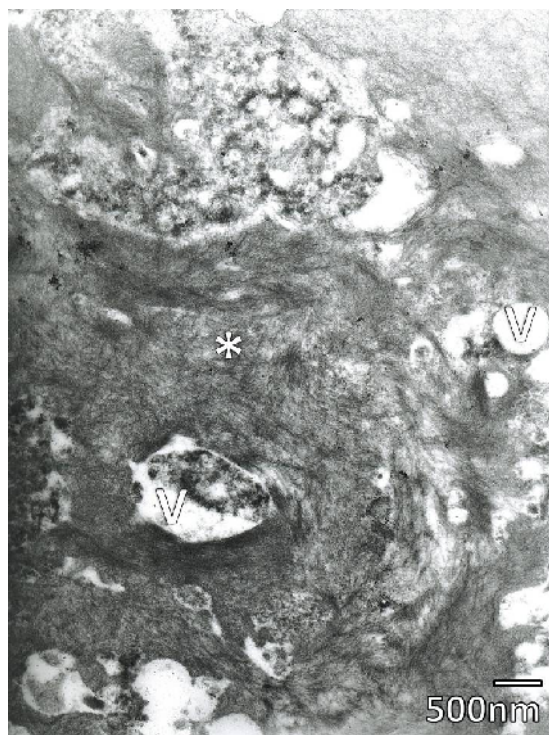


Fig. 1. Sección a 1 cm del tumor en paciente tratado. Obsérvese elementos contráctiles totalmente desorganizados (asterisco) en áreas necrotizadas de células musculares lisas. Nótese la abundancia de vacuolas (V).

A 1 cm del tumor se puede apreciar en pacientes tratados una zona necrótica, correspondiente a células musculares lisas con vacuolización citoplasmática y total desorganización del sistema contráctil (Fig. 1), lo cual es similar a lo observado en pacientes no tratados (Fig. 2), en donde aún se localizan cuerpos densos, mitocondrias edematizadas y placas densas, presentando sin embargo,

la pérdida de la cubierta celular (membranas plasmática y basal).

A 4 cm del tumor también se observa necrosis de células musculares lisas en pacientes tratados (Fig. 3) y no tratados (Fig. 4), determinándose en este último caso la existencia de muerte celular por la ruptura de la cubierta celular.

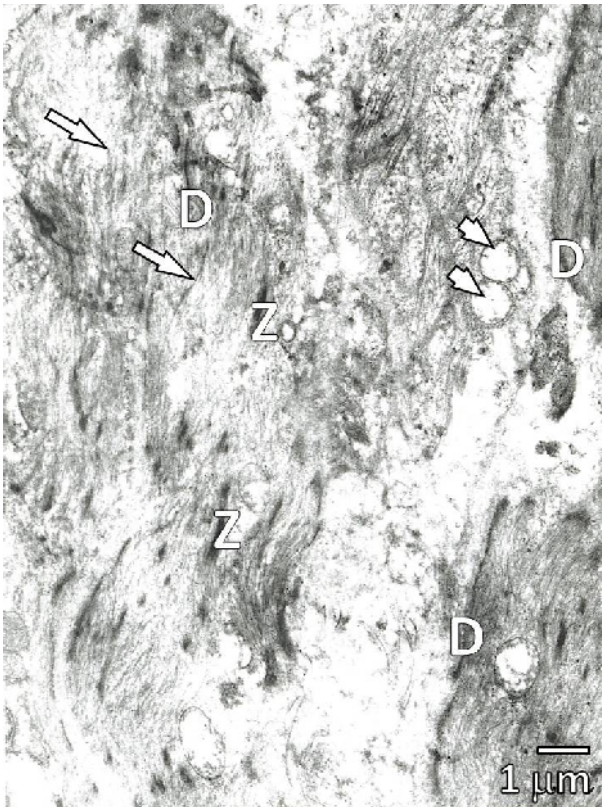


Fig. 2. Sección a 1 cm del tumor en paciente no tratado. En esta área necrotizada de músculo liso, nótese algunos cuerpos densos (Z), miofilamentos aislados (flechas), restos mitocondriales (cabezas de flechas) y placas densas (D).

En ambas condiciones estudiadas y en muestras tomadas a diferentes distancias del borde del tumor, se notó una disminución de cavéolas, vesículas pinocíticas, cuerpos densos y placas densas, en los casos en los cuales las células no estaban necrotizadas, de acuerdo a la conservación de la integridad de la membrana plasmática.

En relación a la inervación amielínica, en los pacientes no tratados se pudo apreciar la disminución de las vesículas sinápticas de los terminales axónicos, así como la disminución y disposición frecuentemente irregular de

neurofilamentos y microtúbulos en los axones (Fig. 5 y 6). Lo mismo ocurrió en el caso de pacientes tratados (Fig. 7 y 8).

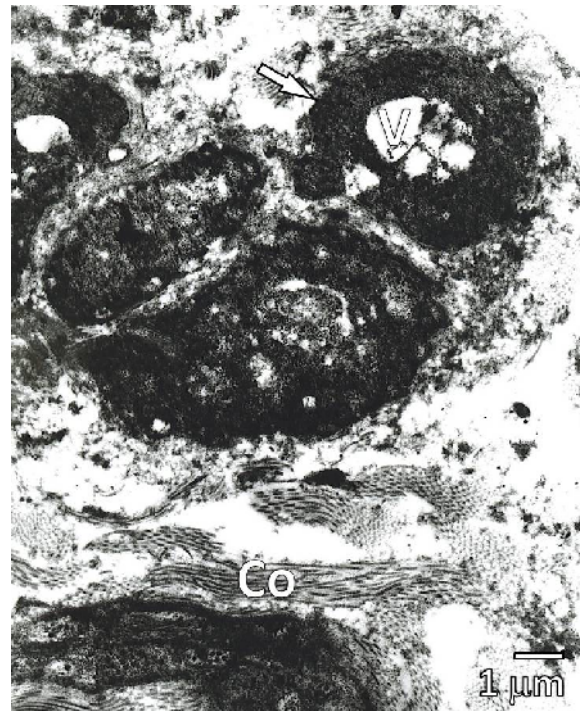


Fig. 3. Sección a 4 cm del tumor en paciente tratado. Restos de célula muscular lisa (flecha) contienen en su interior un área vacuolizada (V). Obsérvese los numerosos filamentos de colágeno (Co).

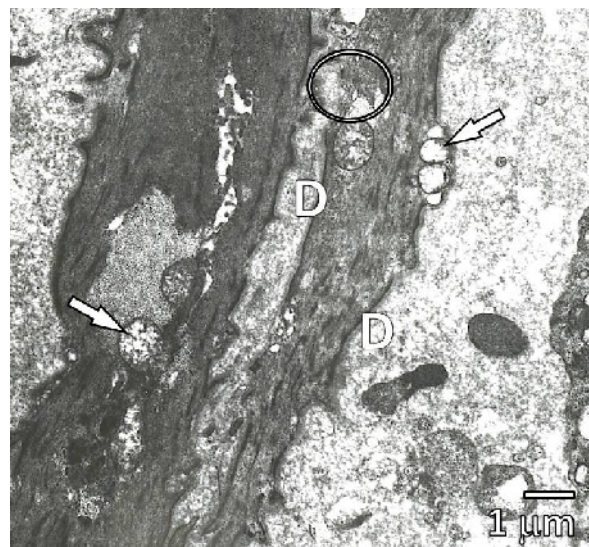


Fig. 4. Sección a 4 cm del tumor en paciente no tratado. En un de las células musculares lisas se aprecian mitocondrias edematizadas (flechas), vacuolas y áreas con pérdida del sarcolema (círculo) y placas densas (D).

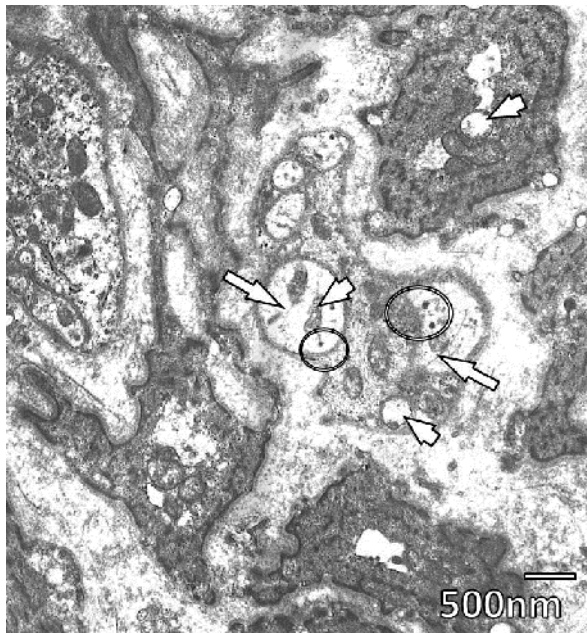


Fig. 5. Sección a 3 cm del tumor de paciente no tratado. En los terminales axónicos de las fibras amielínicas solo se aprecian algunas vesículas sinápticas electrón densas (círculos) y escasos neurofilamentos (flechas). Nótese la presencia de mitocondrias edematizadas (cabezas de flechas).

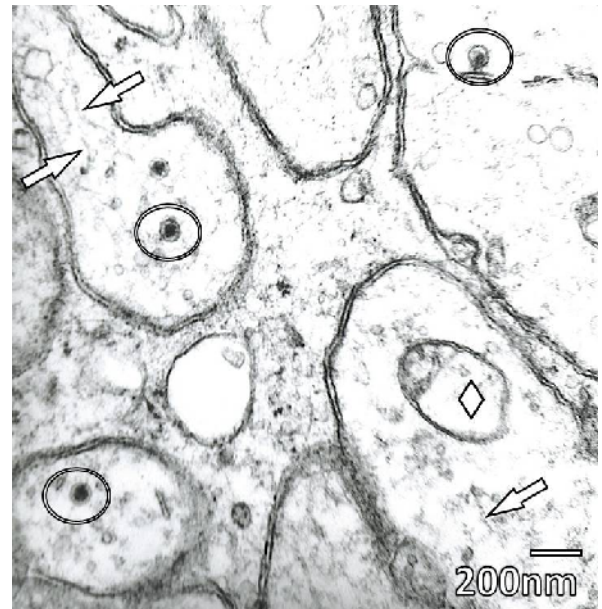


Fig. 7. Sección a 1 cm del tumor en pacientes no tratados. Obsérvese la presencia de escasas vesículas sinápticas en los terminales axónicos (círculos). En los axones se aprecian algunos microtúbulos y neurofilamentos (flechas). Una mitocondria edematizada se localiza en uno de los terminales (rombo).



Fig. 6. Sección a 4 cm del tumor de paciente no tratado. Nótese en los terminales axónicos unas pocas vesículas sinápticas (círculos).

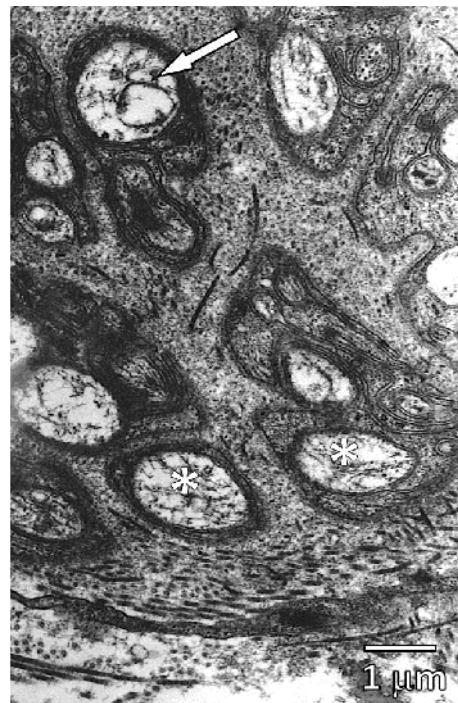


Fig. 8. Sección a 4 cm del tumor en paciente tratado. Los axones amielínicos poseen neurofilamentos y microtúbulos dispuestos desordenadamente (asteriscos). Una mitocondria edematizada es localizada en uno de los axones (flecha).

Adicionalmente, en ambas condiciones las mitocondrias se mostraron edematizadas (Fig. 5, 7 y 8). Es de hacer hincapié en el hecho de que al igual que para las alteraciones descritas en relación a las células musculares lisas, no se pudo constatar una relación entre el grado de alteración y la distancia hasta el borde del tumor.

Las alteraciones en la microvasculatura de áreas peritumorales de pacientes tratados y no tratados, consistieron en el engrosamiento de regiones de la pared endotelial con disminución de cavéolas y vesículas pinocíticas, así como la aparición de prolongaciones del citoplasma endotelial hacia la luz (Fig. 9). Adicionalmente, un número importante de capilares presentó engrosamiento de la membrana basal, frecuentemente reduplicada (Fig. 10).

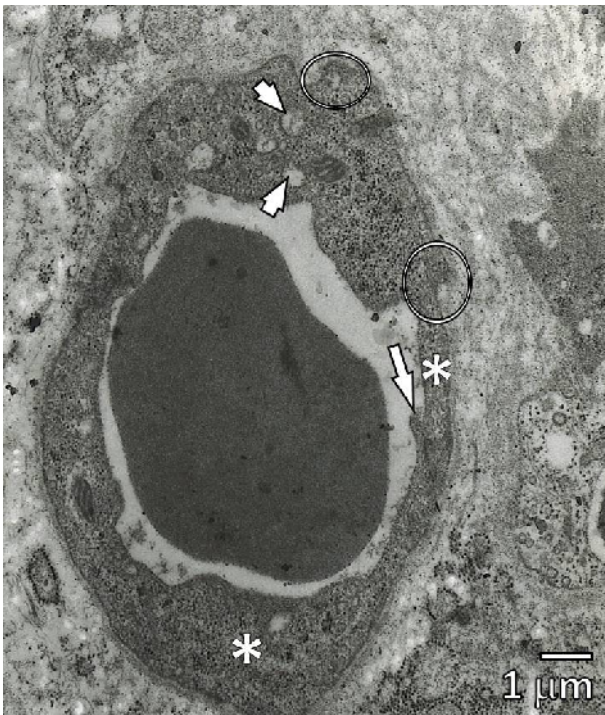


Fig. 9. Sección de capilar en área peritumoral, mostrando una pared endotelial con diferentes grosores (asteriscos), algunas áreas con cavéolas y vesículas (círculos), mitocondrias edematizadas (cabezas de flechas) y prolongación del citoplasma endotelial hacia la luz (flecha).

En la literatura oncológica clásica, dos mecanismos de agresión tisular en pacientes con cáncer son generalmente

descritos. El primero consiste en la invasión progresiva, la infiltración y la destrucción de los tejidos que rodean al tumor primario o sus metástasis [9].. El segundo incluye alteraciones producidas en zonas remotas que no están directamente afectadas por algún foco de la enfermedad, llamado fenómeno paraneoplásico [10 y 11]. Sin embargo, los tejidos no invadidos considerados erradamente por algunos autores como normales [2], y que rodean al tumor maligno primario o sus metástasis han sido poco estudiados a pesar de que en los últimos tiempos se han descrito ultraestructuralmente significativas alteraciones en algunos casos de neoplasias [7,12].

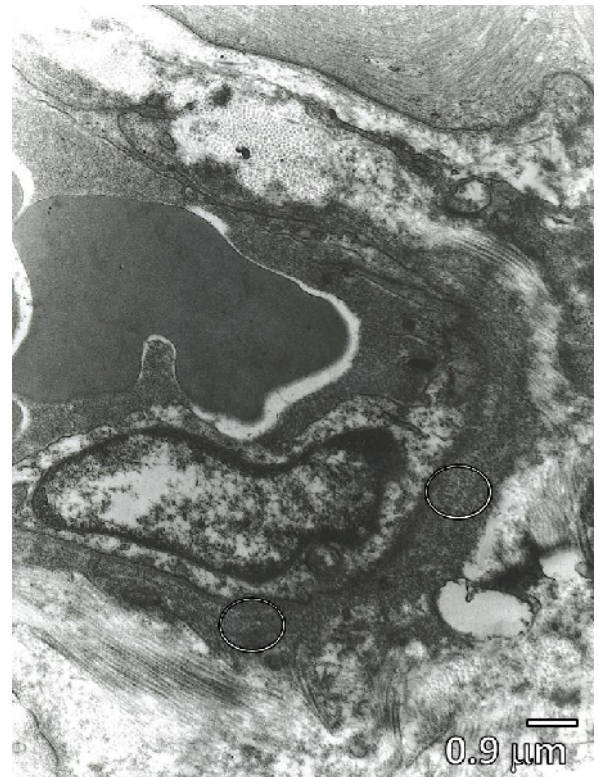


Fig. 10. Nótese la presencia de una membrana basal del capilar engrosada y reduplicada (círculo).

Actualmente, se practica un margen de resección para los tumores de recto que cubre aproximadamente de 2 a 2,5 cm del borde inferior del tumor, incluyendo la zona linfática de la región [13]. No obstante, en la presente investigación se muestran alteraciones ultraestructurales

significativas no solo a 1 cm del tumor maligno, sino también a 3 y 4 cm de éste. Las mismas no dependieron de que los pacientes hayan sido tratados o no tratados con quimioterapia y radioterapia.

Alteraciones en las células musculares lisas han sido reportadas en tejido peritumoral de carcinoma gástrico [3], adenocarcinoma de colon [4] y adenocarcinoma prostático [7]. Al igual que en la presente investigación, en esos trabajos se describieron diferentes cambios como vacuolización sarcoplasmática, disminución de placas densas, cavéolas, vesículas pinocíticas y cuerpos densos, así como el hinchamiento mitocondrial. Adicionalmente, lisosomas y vacuolas autofágicas del tipo de figuras mielínicas también fueron mencionados [3,7], de manera similar a lo observado para el caso del músculo de la lengua [6]. En este último caso, también fue frecuente la presencia de mitocondrias alteradas.

La pérdida de la integridad de la membrana plasmática de la célula muscular lisa, con la consiguiente necrosis observada en la presente investigación coincide con la necrosis segmentaria descrita como efecto peritumoral en el caso de la musculatura de la lengua [6]. En el adenocarcinoma de próstata [7], las interrupciones observadas únicamente ocurrieron a nivel de la membrana basal.

Los daños en la inervación amielínica observados en este trabajo podrían sugerir una relación similar a la apreciada entre el nervio periférico y los efectos paraneoplásicos (remotos) del cáncer. En el caso del músculo esquelético, la inervación motora puede presentar en esa condición axonolisis y desmielinización, con desaparición de las vesículas sinápticas a nivel del terminal axónico [13,14,15]. Es interesante destacar que en la inervación autonómica cardíaca, la crotolina producida por *Crotalus durissus cumanensis* provoca una pérdida de las vesículas sinápticas en los terminales amielínicos, como la mostrada en la presente investigación [17], aun cuando la vía de la diseminación del veneno fue la sanguínea, en tanto que el factor (o factores) liberado por el tumor maligno y probable

causante de las alteraciones observadas posiblemente usó la vía paracrina para producir sus efectos.

Alteración observada en los capilares de pacientes tratados y no tratados fue el engrosamiento de la pared endotelial y de la membrana basal, esta última frecuentemente laminada. Ello coincide con lo descrito como efecto peritumoral en el fibrohistiocitoma maligno (sarcoma pleomórfico indiferenciado de alto grado) y en el adenocarcinoma prostático [7,18]. La aparición de prolongaciones endoteliales hacia la luz también fue apreciada en el adenocarcinoma prostático, al igual que la disminución de cavéolas y vesículas pinocíticas. Varios de los mencionados hallazgos también han sido descritos en el fenómeno paraneoplásico muscular [10]. Sin embargo, en el fenómeno paraneoplásico muscular algunos capilares presentaron un proceso necrótico, aun cuando poco frecuente [10,11]. En áreas peritumorales tal proceso no fue observado.

CONCLUSIÓN

El hecho de observar alteraciones similares en el tejido peritumoral de pacientes tratados y no tratados con quimioterapia y radioterapia sugiere que ambos procedimientos que son adecuados para la eliminación de células cancerosas [19,20], no fueron causantes de la aparición o eliminación de las mencionadas alteraciones en el tejido peritumoral. De manera similar a lo sugerido para el caso de tejido muscular esquelético rodeado por un fibrohistiocitoma maligno [18], es posible que los cambios apreciados en la musculatura lisa, inervación amielínica y microvasculatura próxima al adenocarcinoma de recto, sean provocados por factores liberados por este último.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación contó con el apoyo económico del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la U.C.V. (PI-03-7732-2009/1).

Agradecimiento a la Dra. María Elena Velasco del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Escuela Vargas por permitir el uso del M.E.T. y a la Sra. Beatriz Bello por la realización de los cortes ultrafinos.

REFERENCIAS

- [1] Paweletz N., Boxberger H.J. (1994) "Defined tumor cell – host interactions are necessary for malignant growth" *Crit. Rev. Oncogen.* 5: 69-105.
- [2] Braakhuis B.J.M., Leemans C.R., Brakenhoff R.H. (2004) "Using tissue adjacent to carcinoma as a normal control: an obvious but questionable practice" *J. Pathol.* 203: 620-621.
- [3] Tonino P., Finol H.J., Sosa L., Hidalgo C., Correa M. (1996) "Efectos peritumorales de un carcinoma gástrico sobre la ultraestructura de las células musculares lisas" *Acta Cient. Venez.* 48(Supl. 1): 226.
- [4] Montero E., Finol H.J., Abreu C., Rivero O. (2009) "Efecto de un adenocarcinoma de recto sobre la ultraestructura de las fibras musculares lisas de la muscularis mucosae" *Acta Microsc.* 18(Supl.C): 465-466.
- [5] Lamura A., Finol H.J., Garriga E.A., d'Empaire M.G., Tinoco P.J., Salazar N. (2001) "Carcinoma espinocelular de antro y reborde maxilar: tratamiento quirúrgico, estudio histopatológico y ultraestructural. Reporte de un caso" *Acta Odontol. Venez.* 39: 79-84.
- [6] Lamura A., Finol H.J., Garriga E.A., Muller B., Lamura G. (2003) "Estudio clínico, histopatológico y ultraestructural del músculo de la lengua en pacientes con carcinoma epidermoide" *Acta Odontol. Venez.* 41: 32-38.
- [7] Finol H.J., Gledhill T., Parada D., López C., Moreira O. (2003) "Ultrastructural pathology of smooth muscle tissue surrounding prostatic adenocarcinoma" *Microsc. Microanal.* 9(Supl. 2): 1400-1401.
- [8] Gunderson L.L., Sosin H. (1974) "Areas of failure found at reoperation (second or symptomatic look) following curative surgery for adenocarcinoma of the rectum: Clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy." *Cancer*; 34: 1278-1292.
- [9] Lieberman MW, Levowitz R.M. (1996) "Neoplasia." En: Damjanov I, Linder J. (eds). *Anderson's Pathology*. Vol. 1 (part1). 10th ed. St Louis, Mosby, pp. 513-547.
- [10] Finol H.J., Tonino P., Márquez A., Correa M., Muller B., Sosa L. (1997) "Microvascular pathology in the skeletal muscle paraneoplastic phenomenon" *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 29: 329-334.
- [11] Finol H.J., Márquez A., Navas E., de Navas N.R. (2001) "Extraocular muscle pathology in the paraneoplastic phenomenon associated con retinoblastoma" *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 20: 281-285.
- [12] Finol H.J. (2010) "Mitochondrial alterations in primary tumors, peritumoral regions, distant areas, and metastasis." En: Solórzano G, de Souza W (eds). *Proceedings of 17th International Microscopy Congress. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise*, pp.222-223.
- [13] Charúa L. (2008) "Cáncer de recto". *Rev. Gastroenterol. Mex.* 73 (Supl. 1): 100-104.
- [14] McLeod J.G.(1975) "Carcinomatous neuropathy". En: Dyck P.J., Thomas P.K., Lambert E.H. (eds). *Peripheral neuropathy*. Vol. II. Philadelphia, Saunders, pp.1301-1313.
- [15] Tyler H.R. (1974) "Paraneoplastic syndromes of nerve, muscle and neuromuscular junction". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 230: 348-357.

- [16] Finol H.J., Márquez A., Rodríguez I., Montes de Oca I., Tonino P., Muller B.(1993) “Neuromuscular pathology in the paraneoplastic phenomenon associated with cervix carcinoma” *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 12: 53-58.
- [17] Hernández M., Scannone H., Finol H.J., Pineda M.E., Fernández I., Vargas A.M., Girón M.E., Aguilar I.,Rodríguez-Acosta A. (2007) “Alterations in the ultrastructure of cardiac autonomic nervous system triggered by crotoxin from rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) venom” *Exp. Toxicol. Pathol.* 17: 129-137.
- [18] Finol H.J., Márquez A., Bello B., Rivera H. (1994) “Ultrastructure of skeletal muscle alterations surrounding a malignant fibrous histiocytoma” *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 13: 381-384.
- [19] Thackery E. (2002) “*The Gale encyclopedia of cancer.*” Vol. 1.New York, Gale Group, pp. 89-150.
- [20] DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (2008) “*Cancer: principles and practice of oncology.*” 8th ed. Philadelphia, Williams & Wilkins. pp. 2220-2320