

## INVESTIGACIÓN BÁSICA

# EXPRESIÓN DE LAS ANEXINAS A1 Y A2 EN LA MUCOSA DEL TRACTO AERODIGESTIVO SUPERIOR

J. P. RODRIGO TAPIA<sup>1,2</sup>, J. M. GARCÍA PEDRERO<sup>2</sup>, E. PENA ALONSO<sup>2</sup>, M. P. FERNÁNDEZ<sup>3</sup>,  
R. OWEN MORGAN<sup>3</sup>, C. SUÁREZ NIETO<sup>1,2</sup>, A. HERRERO ZAPATERO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>SERVICIO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS. <sup>2</sup>INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA. UNIVERSIDAD DE OVIEDO. <sup>3</sup>DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. UNIVERSIDAD DE OVIEDO. <sup>4</sup>SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA. HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS. OVIEDO. ASTURIAS.

## RESUMEN

**Introducción:** Las anexinas A1 y A2 se han relacionado con el mantenimiento de la integridad tisular. Han sido identificadas en varios tejidos humanos pero su expresión en el tracto aerodigestivo superior es poco conocida. El objetivo de este trabajo es estudiar la expresión de estas proteínas en la mucosa del tracto aerodigestivo superior. **Material y métodos:** Se estudian muestras de mucosa respiratoria (nasal y laringea) y digestiva (de cavidad oral y faringe) de pacientes intervenidos de cirugía no oncológica. La expresión de las anexinas A1 y A2 se estudia por inmunohistoquímica. **Resultados:**

Ambas anexinas se expresan tanto en el epitelio ciliado pseudoestratificado como en el plano poliestratificado no queratinizado, pero con un patrón diferente; la anexina A1 se expresa en las células más diferenciadas, mientras que la A2 lo hace en las menos diferenciadas (con la excepción de los cilios de las células ciliadas). **Conclusión:** Aunque las anexinas A1 y A2 están estructural y filogenéticamente relacionadas, su diferente expresión en la mucosa del tracto aerodigestivo superior sugiere que participan en funciones claramente diferenciadas.

**PALABRAS CLAVE:** Anexinas. Epitelio. Tracto aerodigestivo. Función.

## ABSTRACT

### EXPRESSION OF ANNEXINS A1 AND A2 IN THE MUCOSA OF THE UPPER AERODIGESTIVE TRACT

**Introduction:** Annexins A1 and A2 have been related with the maintenance of tissue integrity. They have been identified in a wide variety of tissues, but little is known regarding their expression in upper the aerodigestive tract. The aim of this work is to describe the expression of these proteins in the mucosa of the upper aerodigestive tract. **Material and methods:** Tissue samples from respiratory (nasal and laryngeal) and digestive (oral and pharyngeal) mucosa from non-oncological patients were studied. Annexin A1 and A2 ex-

pression was determined by immunohistochemistry. **Results:** Both annexins were expressed in the ciliated and in the stratified non-keratinized epithelia, but with a different pattern; ANXA1 was expressed in the more differentiated cells whereas ANXA2 was expressed in the less differentiated ones (with the exception of the cilia of ciliated cells). **Conclusion:** Although annexins A1 and A2 are structurally and phylogenetically related its expression pattern in the upper aerodigestive tract suggests that they have different functions.

**KEY WORDS:** Annexins. Epithelium. Aerodigestive tract. Function.

**Correspondencia:** J. P. Rodrigo Tapia. C/ Fernández Ladreda, 32-A - 4º B. 33011 Oviedo

E-mail: juanpablo.rodrigo@sespa.princast.es

**Fecha de recepción:** 6-5-2004

**Fecha de aceptación:** 1-6-2004

## INTRODUCCIÓN

Las anexinas constituyen una familia de proteínas caracterizadas por su capacidad de unión a fosfolípidos en presencia de ion calcio. Las anexinas humanas pertenecen a la subfamilia A de las anexinas de los vertebrados, habiéndose identificado 12 miembros. Se designan con el símbolo ANX seguido de un sufijo que indica el número de anexina, desde la A1 a la A11 y luego la A13, pues no hay anexina A12<sup>1</sup>. Desde el punto de vista estructural se caracterizan por un núcleo formado por cuatro dominios repetitivos homólogos (ocho en la anexina A6) de 68-69 aminoácidos cada uno, precedido de una secuencia amino-terminal única<sup>2</sup>. Las diversas funciones de los miembros de la familia vienen conferidas por las divergencias en la secuencia del núcleo central y por el dominio amino-terminal único.

Las anexinas se han implicado en un amplio espectro de procesos celulares y moleculares, que incluyen la modulación de la actividad fosfolipasa A2 y tirosín-quinasa en la transducción de señales, el mantenimiento de la integridad del citoesqueleto y la matriz extracelular, el crecimiento y la diferenciación tisulares, la inflamación y la coagulación sanguínea<sup>2</sup>. Sin embargo la función exacta de las diferentes anexinas permanece desconocida. La anexinas A1 y A2 (ANXA1 y ANXA2 respectivamente) se hallan estructuralmente relacionadas y han sido implicadas en la diferenciación y mantenimiento de la estructura tisular<sup>3,4</sup>. Dichas anexinas han sido identificadas en una amplia variedad de tejidos humanos<sup>5</sup>, pero los estudios que detallan la localización de estas proteínas a nivel celular en dichos tejidos son escasos. Sólo un estudio previo<sup>5</sup> ha analizado la expresión de la ANXA1 y la ANXA2 en el epitelio del tracto aerodigestivo superior, pero no en detalle, al tratarse de un estudio sobre diversos tejidos. La información sobre la localización exacta de estas proteínas en los diferentes tejidos podría ser útil para profundizar en el conocimiento de sus funciones fisiológicas, que se hallan aun en investigación. Con esta intención estudiamos la expresión de las anexinas A1 y A2 en el tracto aerodigestivo superior mediante inmunohistoquímica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestras tisulares

Las muestras de mucosa del tracto aerodigestivo superior fueron obtenidas de pacientes sometidos a cirugía no oncológica, previa obtención del consentimiento informado de los mismos. Las

muestras de mucosa nasal se obtuvieron del cornete medio en pacientes intervenidos de septoplastia. Las muestras de mucosa de la cavidad oral y de la faringe se obtuvieron en pacientes intervenidos de amigdalectomía. Finalmente, las muestras de mucosa laríngea se obtuvieron de la cara laríngea de la epiglotis en pacientes intervenidos de microcirugía laríngea. Las muestras fueron fijadas inmediatamente en formol tamponado y posteriormente deshidratadas en alcoholes de diferentes grados e incluidas en parafina.

### Estudio inmunohistoquímico

Las muestras incluidas en parafina se cortaron en secciones de 4 mm y desecadas en portaobjetos especiales para capilaridad (ChemMate; Bio-TEK Solutions, Santa Barbara, CA, USA). Las secciones fueron desparafinadas con xilol e hidratadas de forma convencional. La recuperación del antígeno se realizó mediante tratamiento con proteinasa K en el caso de la ANXA1 y mediante calor (calentando las muestras en una olla a presión durante 10 minutos en tampón citrato) en el caso de la ANXA2. Las tinciones se realizaron a temperatura ambiente de forma automatizada en una estación de trabajo TechMate 1000 (BioTEK Solutions) de una sola vez para cada marcador. Las muestras estuvieron 15 minutos en un medio bloqueante (peróxido de hidrógeno al 3%) y posteriormente reaccionaron con el anticuerpo primario: el anti-ANXA1 (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) a una concentración de 1:200 y el anti-ANXA2 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA USA) a una concentración de 1:400, durante 30 minutos. La inmunodetección se realizó con el sistema Envision (Envision Plus, Dako, Carpinteria, CA, USA) empleando como cromógeno la diaminobenzidina. Una tinción con hematoxilina durante 1 minuto fue el paso final. Tras la tinción las secciones fueron deshidratadas y montadas con un cubreobjetos empleando un medio estándar. Se incluyeron controles negativos con omisión del anticuerpo primario. El endotelio vascular, en el que previamente se ha demostrado expresión de ambas anexinas, se empleó como control positivo de expresión.

## RESULTADOS

### Epitelio respiratorio

El epitelio respiratorio (ciliado pseudoestratificado) de la mucosa nasal y laríngea mostró expresión

de ambas anexinas, aunque con un patrón diferenciado. La ANXA1 se expresaba intensamente en los cilios y en la superficie apical de las células ciliadas, de forma moderada en los núcleos de estas células y débil en el citoplasma de las mismas. No se observó expresión de la ANXA1 en las células basales ni en las caliciformes (Figura 1A). La ANXA2 también se expresaba intensamente en la superficie apical y los cilios de las células ciliadas, y tampoco se expresaba en las células caliciformes. Una débil expresión se podía apreciar en la membrana lateral de las células ciliadas. Pero, en contraposición a la ANXA1, la ANXA2 mostraba una intensa expresión membranosa en las células basales y débil en el citoplasma de las mismas, no existiendo en ningún caso expresión nuclear (Figura 1B).

### Epitelio digestivo

El epitelio plano poliestratificado no queratinizado de la cavidad oral y la faringe también

mostraba expresión de las dos anexinas estudiadas y, al igual que en el epitelio respiratorio, el patrón de expresión era diferente para cada anexina. La ANXA1 mostró una expresión creciente desde las células parabasales hacia la superficie del epitelio. Las células basales y parabasales no mostraban expresión de esta proteína; la expresión era membranosa en las células de la capa intermedia del epitelio, y tanto de membrana como citoplasmática en las células más superficiales, en las cuales también se observaba expresión nuclear (Figura 2A). La ANXA2 mostró un patrón de expresión opuesto, la expresión disminuía desde las células basales hacia la superficie del epitelio. Así, las células basales y del estrato intermedio del epitelio presentaban una tinción membranosa, más intensa cuanto más basal se localiza la célula, mientras que las células superficiales, más diferenciadas, no mostraron expresión de la ANXA2. No se observó expresión nuclear de esta proteína (Figura 2B).

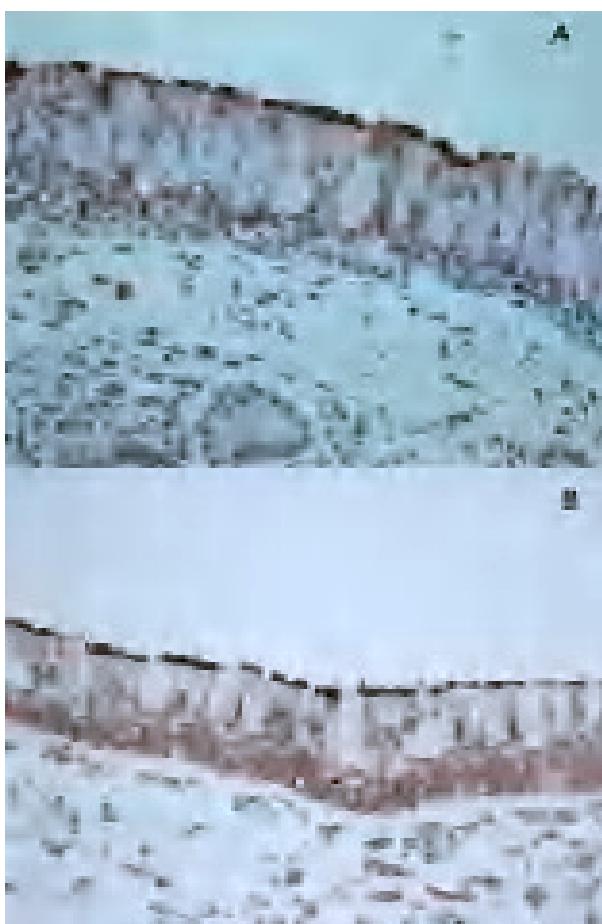


Figura 1. Expresión de las anexinas A1 (A) y A2 (B) en el epitelio ciliado respiratorio (hematoxilina, X400).

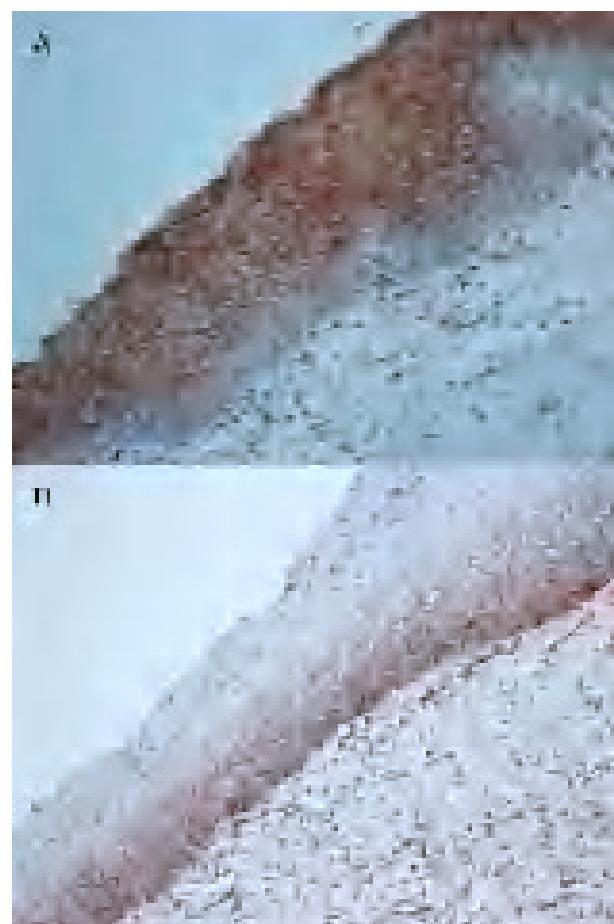


Figura 2. Expresión de las anexinas A1 (A) y A2 (B) en el epitelio plano estratificado no queratinizado (hematoxilina, X400).

### Epitelio glandular

Las glándulas seromucosas existentes en la mucosa respiratoria nasal y las glándulas salivares accesorias de la mucosa digestiva mostraban un patrón de expresión similar para las ANXA1 y ANX A2. Las células acinares fueron negativas para ambas anexinas (Figura 3A y 3C), mientras que el epitelio de los conductos excretores sí mostraba expresión de las mismas, aunque con un patrón diferenciado (Figura 3B y 3D): la ANXA1 se expresaba intensamente en el citoplasma y el núcleo de las células del epitelio ductal, mientras que la ANX A2 sólo lo hacía en la superficie apical de las mismas, y débilmente en las membranas laterales.

### DISCUSIÓN

Aunque las anexinas A1 y A2 se hallan estrechamente relacionadas, tanto desde el punto de vista filogenético como estructural, su patrón de expresión en las mucosas del tracto aerodigestivo superior sugiere que ambas proteínas participan en funciones claramente diferenciadas. En el epitelio plano poliestratificado no queratinizado apreciamos cómo las anexinas A1 y A2 presentan un patrón inverso de expresión: mientras que la expresión de la ANXA1 aumenta desde las capas

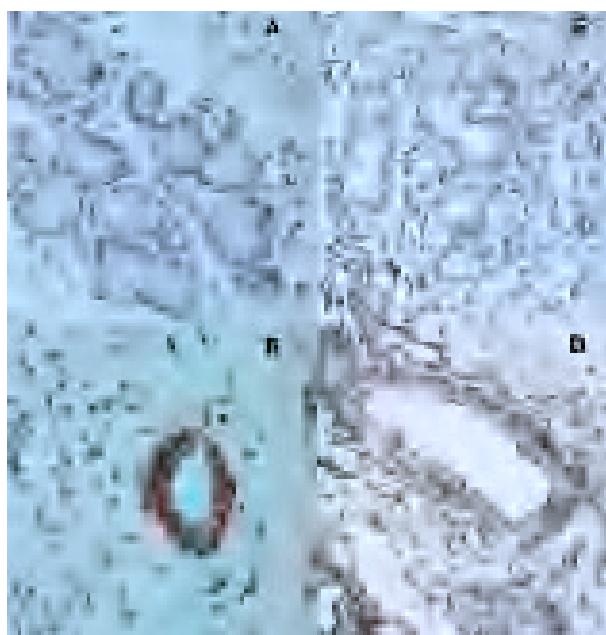


Figura 3. Expresión en las glándulas seromucosas de la anexina A1 (A, en las células acinares y, C, en los ductos excretores) y de la anexina A2 (B, en las células acinares y, D, en los ductos excretores) (hematoxilina X400).

basales a las más superficiales, la expresión de la ANXA2 disminuye. Igualmente, en el epitelio ciliado, aunque ambas anexinas se expresan en los cilios, la ANXA2 se expresa en las células basales, hallándose ausente en las mismas la ANXA1. Esto sugiere que la expresión de estas anexinas se halla relacionada con el estatus de diferenciación de las células epiteliales. En las glándulas salivares y seromucosas apreciamos una ausencia de la expresión de ambas anexinas en las células acinares, hallándose expresadas en el epitelio ductal. Esto hace suponer que estas anexinas también podrían tener un papel en el intercambio de iones y proteínas.

Nuestros hallazgos coinciden con lo descrito previamente, aunque con menos detalle, para la ANXA1 por Dreier y cols.<sup>5</sup>. Sin embargo, estos autores no hallan expresión de la ANXA2 en el epitelio plano estratificado del tracto digestivo superior, aunque sí en el epitelio ciliado respiratorio (pero no especifican en qué células). Los diferentes anticuerpos empleados por dichos autores y nosotros pueden explicar estas discrepancias. A favor de nuestros hallazgos, recientemente se ha descrito la expresión de la ANXA2 a nivel de ARNm en el epitelio esofágico normal<sup>6</sup>, similar al faringeo.

El patrón de expresión hallado en nuestro estudio es concordante con alguna de las funciones propuestas para las anexinas. La ANXA1 ha demostrado tener actividad anti-inflamatoria y sus niveles más elevados de expresión se encuentran en las células implicadas en la respuesta inflamatoria, en concreto en las células mieloides<sup>7</sup>. Además de esta acción anti-inflamatoria, en otros tipos celulares, la ANXA1 ha sido implicada en varias funciones celulares como la transducción de señales, la unión entre el citoesqueleto y la membrana, y el control de la proliferación y diferenciación<sup>8</sup>. De esta forma, nuestro hallazgo de un aumento de la expresión de la ANXA1 a mayor diferenciación celular (capas más superficiales) en el epitelio plano estratificado apoya su papel en la diferenciación celular. Aunque la función exacta de la ANXA2 no ha sido tampoco bien establecida, se ha sugerido su participación en la coagulación sanguínea, la remodelación de la matriz extracelular, la exocitosis dependiente de  $Ca^{2+}$ , la endocitosis y la adhesión celular<sup>9</sup>. El patrón de expresión que encontramos en el epitelio estratificado del tracto aerodigestivo superior es similar al descrito para otras moléculas implicadas en la adhesión celular, como son la E-cadherina y las CD44<sup>10,11</sup>, lo cual sugiere que también la ANXA2 pudiera participar en esta función en este epitelio.

Otra función en que han sido implicadas las

anexinas A1 y A2 es en la organización de los dominios de la membrana celular en las células polarizadas situadas en las superficies luminares, como por ejemplo las células ciliadas del epitelio respiratorio. Esta función la podrían realizar mediando en los contactos membrana-membrana o membrana citoesqueleto<sup>2</sup>. En este sentido, nuestro hallazgo de una intensa expresión de ambas anexinas en la superficie apical y los cilios de las células ciliadas es concordante con esta función. Este patrón de expresión de las ANXA1 y ANXA2 ha sido descrito en

otras partes del aparato respiratorio<sup>12</sup> y en otras células ciliadas de otros órganos<sup>13</sup>.

En conclusión, la expresión de las anexinas A1 y A2 en la mucosa del tracto aerodigestivo superior que hallamos en este estudio sugiere que ambas tienen funciones diferenciadas. Ambas parecen estar relacionadas con la organización de la membrana celular en las células ciliadas, pero además la ANXA1 parece tener un papel en la diferenciación celular mientras que la ANXA2 lo tendría en la adhesión.

## REFERENCIAS

- 1.- Morgan RO, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Balsara BR, Testa JR, et al. Novel human and mouse ANXA10 are linked to the genome duplications during early chordate evolution. *Genomics* 1999; 60: 40-49.
- 2.- Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 2002; 82: 331-371.
- 3.- Violette SM, King I, Browning JL, Pepinsky RB, Wallner BP, Sartorelli AC. Role of lipocortin I in the glucocorticoid induction of the terminal differentiation of a human squamous carcinoma. *J Cell Physiol* 1990; 142: 70-77.
- 4.- Fernandez MP, Morgan RO. Structure, function and evolution of the annexin gene superfamily. In: *Annexins: Biological Importance and Annexin-Related Pathologies*, Bandorowicz-Pikula J (ed), Landes Bioscience: Georgetown, Texas, 2003; 21-37.
- 5.- Dreier R, Schmid KW, Gerke V, Rieheman K. Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol* 1998; 110: 137-148.
- 6.- Zhi H, Zhang J, Hu G, Lu J, Wang X, Zhou C, et al. The deregulation of arachidonic acid metabolism-related genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 106: 327-333.
- 7.- Perretti M. Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 545-52.
- 8.- Frey BM, Reber BFX, Vishwanath BS, Escher G, Frey FJ. Annexin I modulates cell functions by controlling intracellular calcium release. *FASEB J* 1999; 13: 2235-2245.
- 9.- Waisman DM. Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem* 1995; 149: 301-322.
- 10.- Rodrigo JP, Dominguez F, Alvarez C, Manrique C, Herrero A, Suárez C. Expression of E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations to clinicopathological features. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1059-1064.
- 11.- Rodrigo JP, Dominguez F, Alvarez C, Herrero A, Suárez C. Clinicopathologic significance of expression of CD44s and CD44v6 isoforms in squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 67-72.
- 12.- Vishwanatha JK, Muns G, Beckmann JD, Davis RG, Rubinstein I. Differential expression of annexins I and II in bovine epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 280-286.
- 13.- Chailley B, Pradel LA. Immunodetection of annexins 1 and 2 in ciliated cells of quail oviduct. *Biol Cell* 1992; 75: 45-54.