



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

CREACIÓN DE UN MODELO TUMORAL EN CONEJO POR IMPLANTACIÓN
DE CÉLULAS VX2.

DEVELOPMENT OF A RABBIT CANCER MODEL BY USING VX2 CELLS

Autor/es

Ricardo de Miguel Moral

Director/es

José Aramayona Alonso
María Jesús Muñoz Gonzalvo

Facultad de Veterinaria

2015 / 2016

ÍNDICE

1. RESUMEN / ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	5
4. MATERIAL Y MÉTODOS	6
4.1 Animales	6
4.2 Fragmentos del tumor VX2.	6
4.3 Implantación del tumor.	7
4.4 Post-operatorio y monitorización de los animales.	8
4.5 Controles ecográficos.	9
4.6 Hemograma y Bioquímica sanguínea.	9
4.7 Eutanasia, necropsia y toma de muestras	10
4.8 Histoquímica e inmunohistoquímica	10
5. RESULTADOS	11
5.1 Controles ecográficos.	12
5.2 Analíticas sanguíneas.	15
5.3 Necropsia.	15
5.4 Tinción histológica con H&E	16
5.5 Tinciones inmunohistoquímicas	19
6. DISCUSIÓN	22
7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	25
8. VALORACIÓN PERSONAL	26
9. AGRADECIMIENTOS	27
10. BIBLIOGRAFÍA	28

RESUMEN

Hemos avanzado en la creación de un modelo animal de proliferación tumoral en hígado, riñón y músculo de conejo por implantación de fragmentos de tumores VX2 como herramienta para la valoración de futuros ensayos antineoplásicos. Para cada modelo hemos utilizado 3 conejos de raza Neozelandesa a los que se les ha realizado un implante quirúrgico del fragmento tumoral y un seguimiento ecográfico para evaluar el progresivo aumento de tamaño y la influencia del tejido del hospedador en sus características anatómo-patológicas, así como la posible aparición de neo-vascularización y presencia de metástasis. Finalmente, los animales han sido eutanasiados y se han recogido muestras del tumor para su análisis anatómo-patológico mediante una tinción convencional y técnicas inmunohistoquímicas, permitiendo de este modo su estudio comparado en los diferentes órganos diana.

Los resultados permiten establecer las bases para el desarrollo de futuros estudios en los que se pretende valorar la eficacia de nuevas moléculas y/o vehículos antineoplásicos.

ABSTRACT

We have initiated the creation of an animal model of tumor proliferation in liver, kidney and muscle in rabbit by implanting VX2 tumor fragments as a tool for assessing future antineoplastic trials. For each model we used three New Zealand White rabbits that have undergone a surgical implant of a VX2 fragment. Ultrasound monitoring allowed to assess the progressive increase in size and the influence of host tissue in their anatomical and pathological characteristics as well as the possible emergence of neo-vascularization and metastasis. Finally, the animals were euthanized and tumor mass excised for histopathological analysis by conventional staining and immunohistochemical techniques, thus enabling a comparative study in the different target organs.

These results allow to establish the basis for the development of future studies which aims to assess the effectiveness of new molecules and / or antineoplastic vehicles.

INTRODUCCIÓN

La evaluación de las terapias antitumorales suele realizarse en dos fases: *in vitro* e *in vivo*. A pesar de que los resultados *in vitro* son extremadamente valiosos como sistema de valoración inicial¹, tienen el grave inconveniente de su dificultad de extrapolación a una situación clínica como consecuencia de factores del propio tumor¹⁰ (angiogénesis, factores de crecimiento tumoral, etc.) y del paciente (metabolismo, distribución tisular, etc.). Por todo ello, antes de dar por válida una nueva terapia se hace imprescindible la creación de modelos animales de crecimiento tumoral que permitan estudiar la aplicación de protocolos terapéuticos en un ambiente clínico. En este sentido, los estudios preclínicos *in vitro* deben seguir optimizándose para que nos permitan obtener predicciones cada vez más precisas y extrapolables a los pacientes¹.

Por otra parte, y no sin olvidar los problemas éticos y de bienestar animal intrínsecamente ligados a estas técnicas, los modelos animales necesitan ser tan representativos de la realidad estudiada como sea posible. Por ello, antes de iniciar una fase experimental en la que se valore la actividad, eficacia y seguridad de un nuevo fármaco o forma de administración es necesario obtener una serie completa de resultados en los que se compruebe la ecología, forma de crecimiento, capacidad y velocidad de división, capacidad de neovascularización y un sin fin de otros factores dependientes del modelo animal en cuestión¹⁶.

Al ser un modelo clásico, es obvio que la literatura recoge una gran cantidad de valiosa información sobre el crecimiento de tumores tras la implantación de células VX2⁵⁻⁶. Sin embargo, aun siendo extremadamente válida y estando publicada en revistas de impacto, las condiciones particulares del experimento y del equipo de investigación, así como la infraestructura con la que se realiza el experimento pueden relativizar en gran medida una aplicación directa de estos resultados. Por otra parte, futuros experimentos a realizar en el laboratorio de Farmacología, requerirán la consideración de la vascularización y, en consecuencia, del grado de oxigenación del tejido huésped como una de las principales variables en el futuro éxito de los fármacos estudiados¹⁰. Así, hemos planteado la creación de tres modelos: (1) Riñón, como órgano extremadamente oxigenado ya que, en condiciones normales, este órgano recoge aproximadamente un 25% del gasto cardiaco, es decir, en un conejo de unos 2 kg de peso unos 50 ml/min. (2) El hígado, como órgano de oxigenación mixta. La irrigación de este órgano es compleja, ya que solo un 25% del aporte sanguíneo llega a través de la arteria hepática y, por tanto, es sangre fuertemente oxigenada mientras que el

75% restante llega a través de la vena porta con un nivel de saturación de O₂ bajo. (3) El músculo es un tejido de características especiales, pues su grado de oxigenación es dependiente de las condiciones de estrés metabólico al que está sometido en cada momento. En condiciones de reposo recibe una irrigación baja, aunque cuando se exige un esfuerzo físico, su aporte sanguíneo aumenta exponencialmente.

En este trabajo, se propone realizar un estudio experimental en el que se procederá a dar los primeros pasos para la creación de un modelo de proliferación tumoral en hígado, riñón y músculo por implantación de células VX2, en conejo, procedentes de un carcinoma de células escamosas inducido por Papillomavirus³, con gran capacidad de proliferación y de invasión tisular. Tras el éxito obtenido el año pasado por el laboratorio de Farmacología en el desarrollo de un modelo hepático, este año nos centraremos en ampliar el modelo a dos nuevos órganos diana, el riñón y el músculo, permitiendo de este modo la ampliación del modelo de crecimiento tumoral en conejo.

Dado que se trata de un estudio inicial, utilizaremos 9 conejos de raza Neozelandesa (3 para hígado, 3 para riñón y 3 para músculo) en los que se implantará quirúrgicamente el tumor, con posterior seguimiento ecográfico semanal para detectar su crecimiento y valorar la aparición de neo-vascularización.

Cuando el tumor alcance un tamaño adecuado¹³, sin presencia de metástasis lejanas, realizaremos la eutanasia del mismo, posterior necropsia y exéresis del tumor y los tejidos adyacentes. Por último, se procederá a realizar un análisis anatómico-patológico de las muestras obtenidas mediante una tinción convencional y técnicas inmunohistoquímicas que nos permitan su estudio comparado en los diferentes órganos diana.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La elección de este tema como trabajo de fin de grado responde a distintos intereses personales. Por un lado, un interés por conocer de primera mano el campo de la investigación y formar parte de un proyecto experimental en el que se aúnan el trabajo de laboratorio con la revisión bibliográfica y, por otro lado, la buena relación con el Departamento de Farmacología y la especial curiosidad por su proyecto con estudiantes iniciado durante el curso 2014/15.

Nuestro objetivo, será determinar las características del desarrollo tumoral una vez implantado, así como el momento óptimo en el que sería viable realizar ensayos de valoración de fármacos antineoplásicos. El desarrollo completo del modelo que aquí iniciamos permitirá el estudio de futuros fármacos y/o protocolos antineoplásicos en un ámbito clínico, en el cual, a menudo, surgen inconvenientes que no son tenidos en cuenta en los procedimientos “in vitro”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

El modelo animal utilizado en los experimentos de este trabajo, ha sido conejos de Raza Neozelandesa, procedentes del Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal (SAEA) de la Universidad de Zaragoza. Todos los experimentos y procedimientos seguidos, han sido aprobados por el Comité Ético para Animales de Experimentación de la Universidad de Zaragoza (PI09/13)

Se han utilizado un total de nueve conejos macho de $2,1 \pm 0,3$ kg con dos meses de edad, clínicamente sanos divididos en tres lotes ($n=3$), un lote por cada órgano estudiado (hígado, riñón y músculo).

Los animales, fueron alojados individualmente en jaulas de estabulación con pienso estándar y agua *ad libitum*, con ciclos de luz de 12 horas y condiciones ambientales de temperatura (21-23°C) y humedad relativa (55%) controlada.

Fragmentos del tumor VX2

Se han empleado fragmentos tumorales (1x1mm, aproximadamente) obtenidos en Farmacología en un estudio piloto realizado en abril del 2014 en un animal considerado como portador.

La masa tumoral desarrollada en el hígado de este animal se diseccionó hasta separarla del tejido sano circundante y, posteriormente, se fragmentó. Los fragmentos han sido conservados desde entonces en medio RPMI 1640-glicerol (70:30), a -150 °C, asegurando de esta manera la homogeneidad genética de los fragmentos implantados. Inmediatamente antes de su implantación, cada fragmento tumoral individual se descongeló rápidamente por inmersión en un baño a 37 °C.

Los fragmentos tumorales iniciales, usados durante aquella primera prueba, fueron generosamente cedidos por el Dr. David Melodelima (CERN, Unit 556, Lyon, France).

Implantación del tumor

Para estandarizar en lo posible los resultados obtenidos y minimizar la posibilidad de que los animales padecieran algún tipo de dolor injustificado, se siguió un detallado y riguroso “Protocolo de implantación” que abarcaba desde la observación y pesado del animal previo a la cirugía hasta su despertar (Ver Anexos I y II) y posterior control clínico.

Los animales fueron pre-anestesiados por administración de 5 mg/kg de medetomidina (Medetor®), por vía intramuscular (IM), consiguiendo, de esta forma, una buena sedación y analgesia. Tras un periodo de inducción de 10 minutos, se procedió a la anestesia completa de los animales por administración IM de una mezcla de 25 mg/kg de ketamina (Imalgene 100®) + 0,4 mg/kg de butorfanol (Torphasol®), combinando de esta forma la anestesia disociativa del primero con el poder analgésico del segundo.

Con el animal anestesiado, se procedió a la colocación de un catéter venoso de 22G en la vena marginal de la oreja derecha de los animales. Dicha vía fue utilizada para la extracción de sangre, con la que posteriormente se realizó un hemograma y analítica iniciales. Además, fue utilizada para infundir fluidos (solución salina, 5 ml/kg/h). Por último, se rasuró el campo quirúrgico y se trasladó el animal a la mesa del quirófano, donde se procedió a la desinfección con povidona yodada y a la infiltración intradérmica con 0,2 ml de lidocaína 2% (Anesvet®) para desensibilizar la región cutánea donde se efectuaría la incisión. Cuando fue necesario, la anestesia se prolongó con la administración de ketamina en un bolus IV de 0,1 ml de Imalgene 100®.

La primera fase de la intervención tenía como fin el acceso al punto de implantación y, por lo tanto, fue distinta para cada órgano.

- En el caso del hígado, la técnica quirúrgica, consistió en una incisión sub-xifoidea de unos 2 cm a través de la piel y los músculos del abdomen, a través de la cual se visualizó el extremo ventro-caudal del lóbulo hepático izquierdo.
- Para el riñón se prefirió una laparotomía paramedial izquierda, aproximadamente 3 cm por detrás de la última costilla. Tras incidir en los planos cutáneo y musculares, se retiró la grasa perirrenal que envuelve al riñón, dejando al descubierto el polo apical del riñón izquierdo, donde se implantó el fragmento.

- Para la implantación en músculo el procedimiento fue mucho más sencillo, ya que únicamente consistió en incidir el plano cutáneo de la extremidad posterior derecha a nivel de la zona media del glúteo mayor. Con una apertura de aproximadamente un centímetro fue más que suficiente para acceder sin dificultad a dicho tejido.

Una vez accedimos al lugar de elección en cada órgano procedimos a realizar la implantación del tumor. Para ello utilizamos dos lancetas de aproximadamente 0.5 cm de longitud, la primera con borde punzante para penetrar en el órgano con un corte limpio y la segunda, de bordes romos, para sustituir a la primera y para permitir tracción sobre el órgano sin hacer más amplio el lugar de penetración. Los fragmentos de tumor fueron introducidos con unas pinzas dentadas finas en la cavidad formada entre la lanceta y el órgano. Una vez introducida la masa, se realizó hemostasia por presión con la ayuda de una torunda con un doble objetivo: en primer lugar, frenar el ligero sangrado y, en segundo lugar, asegurar que el injerto permaneciera en el interior del órgano.

Una vez implantado, sólo quedaba suturar los diferentes planos incididos. La sutura de los planos musculares, realizada en las implantaciones en hígado y riñón, consistió en una sutura continua con hilo de gliconato, monofilamento y absorbible 2/0 (Monosyn®, Braun). El cierre del tejido cutáneo se realizó con grapas estériles (Precise™ Vista, 3M), 3 en los conejos con implante en músculo y 5 para los animales con implante en hígado o riñón.

Finalmente, se realizó el lavado de la herida con solución salina y se cubrió la zona con gasas y un vendaje para que no tuvieran acceso a las mismas.

Inmediatamente después de la intervención, se administraron 0,5 mg/kg de butorfanol (Torphasol®) y 5 mg/kg de enrofloxacin (Alsir®) a cada animal, ambas por vía IM, para asegurar una buena cobertura analgésica y antibiótica. Los animales se controlaron hasta su completo despertar, se tomó la temperatura rectal y se le alojó en una jaula individual sobre una bolsa térmica.

Post-operatorio y monitorización de los animales

Durante los cinco días siguientes a la implantación, se siguió un riguroso protocolo de control de los animales cada 12 horas, que incluía la revisión de su estado, temperatura rectal, cura de las heridas con povidona yodada, así como la administración de analgésicos y antibióticos.

La analgesia se realizó con butorfanol (Torphasol®) durante las 24 primeras horas por su mayor poder analgésico al tratarse de un opioide mixto. Se emplearon dosis de 0,5 mg/kg cada 12h, la primera de ellas por vía IM una vez finalizada la intervención y la segunda de ellas por vía SC. Después se mantuvo control analgésico con meloxicam (Metacam®) a dosis de 0,3 mg/kg cada 24h por vía SC durante 4 días adicionales.

El antibiótico de cobertura elegido fue enrofloxacin (Alsir®), a dosis de 5 mg/kg, cada 24 h, por vía IM, durante el primer día y por vía SC durante los 4 días restantes de tratamiento.

Una vez transcurridos los 5 días post-quirúrgicos iniciales se pasó a un protocolo de vigilancia y cura de herida cada 24 h durante 5 días más. Al concluir este periodo se procedió a la retirada de las grapas y a la realización del primer control ecográfico, coincidiendo con el día 10 del experimento.

Controles ecográficos

Se realizaron tres controles ecográficos a todos los animales, a los 10 días post-implantación, coincidiendo con la retirada de grapas y, posteriormente, a los 14 y los 17 días. Este seguimiento ecográfico permitió concretar el momento en que comenzaba a detectarse el tumor y medir su tamaño para cuantificar su crecimiento a lo largo del tiempo.

Para la realización de dichos controles se empleó un ecógrafo ALOKA SSD-1100 Flexus convencional, dotado de una sonda plana en modo B y/o Doppler pulsado.

Hemograma y Bioquímica sanguínea

Con el fin de valorar el estado general de los animales y los posibles efectos a nivel sistémico producidos por el crecimiento del tumor se realizaron dos extracciones de sangre a cada conejo, la primera de ellas en el momento de la implantación y la segunda instantes antes de proceder a la eutanasia del animal.

Se enviaron las muestras al laboratorio Albeitar, donde se realizó un hemograma completo y paneles hepáticos, renales y de destrucción muscular, coincidiendo con cada localización.

Eutanasia, necropsia y toma de muestras

Por último, tras la realización del último control ecográfico, los animales fueron eutanasiados por administración de una sobredosis (100 mg/kg) de pentobarbital sódico (Dolethal®), por vía IV a través de la vena marginal de la oreja.

Tras el sacrificio de los animales, se realizó una necropsia con el fin de tomar medidas reales del tamaño de las masas, así como para realizar la exéresis del tumor. Una vez extraído fue conservado en formaldehído (10%) tamponado (pH 7,4) y remitido al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Miguel Servet, donde fueron amablemente procesadas. También se observó la cavidad abdominal y torácica para valorar la presencia de posibles metástasis y otras alteraciones relevantes.

Histoquímica e inmunohistoquímica

Para ello primero se procedió a la fijación con formaldehído y la posterior inclusión en parafina, lo cual proporciona a las muestras la consistencia adecuada para permitir el corte en secciones de 3 µm.

Una vez obtenidos los cortes histológicos deseados se procedió a la tinción de los mismos. Para ello decidimos realizar tres tipos de tinciones diferentes:

- En primer lugar, una tinción básica hematoxilina-eosina, para permitir una descripción general del crecimiento del tumor.
- A parte se realizó el marcaje inmunohistoquímico de la citokeratina *CK34β E12*. Dicho antígeno nos proporciona un marcaje específico de la estirpe epitelial y, por lo tanto, permite distinguir los carcinomas epiteliales de otras malignidades no epiteliales
- Un marcaje inmunohistoquímico con anticuerpos frente a p63, una proteína perteneciente a la familia p53, que se expresa con frecuencia en tumores de células escamosas.
- Finalmente, un marcaje con antígeno específico de hepatocitos (HepPar-1) en muestras de hígado, como punto de referencia del límite del tejido sano.

Para el análisis de las muestras se utilizó un microscopio óptico (Nikon Eclipse E400) con objetivos de 10, 20, 40 y 60 aumentos. La toma de imágenes se realizó mediante un sistema de captación digital (Nikon Digital Sight DS-5MC) acoplado al microscopio.

RESULTADOS

La implantación se produjo con éxito en los 9 animales en los que se realizó el experimento. Su seguimiento clínico diario consistió en la toma de la temperatura rectal, exploración física, comportamiento, y consumo de alimento y agua, lo cual permitió constatar que permanecían en buen estado, sin aparición de patologías concomitantes. La temperatura se mantuvo dentro de los límites normales durante los 14 días de la experiencia (Tabla 1) salvo en un animal en el que se detectó la aparición de fiebre en el día 4 por lo que se optó por un cambio de antibiótico (cefotaxima 10mg/kg/12 horas durante 5 días adicionales, vía IM), observándose una clara mejoría al cabo de 24 horas.

ID. ANIMAL	PRE-QUIR	POST-QUIR	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5
MUS.1	37,9	35,8	37,8	39,0	39,0	39,0	38,8
MUS.2	38,9	37,3	39,6	39,5	39,0	38,8	38,9
MUS.3	38,1	35,4	38,4	38,2	38,1	38,7	38,4
LIV.1	38,3	35,1	37,5	38,6	38,5	38,1	38,1
LIV.2	38,5	36,7	37,0	38,6	39,1	38,6	37,5
LIV.3	38,0	37,0	39,2	38,8	39,0	38,0	38,5
KID.1	37,8	35,7	38,0	38,3	39,2	39,1	38,9
KID.2	38,5	36,9	39,1	39,2	39,9*	39,3	39,0
KID.3	37,7	34,6	38,7	38,8	39,2	39,0	38,6

Tabla 1: Registro de la temperatura corporal (°C) obtenido en los animales utilizados en el estudio antes de la implantación y durante los 5 días posteriores.

Como precaución, se instauró un régimen rutinario de administración diaria de un analgésico no esteroideo por vía parenteral para evitar en lo posible cualquier tipo de malestar provocado por la cirugía. Tras los primeros cinco días de seguimiento intensivo y hasta el momento del sacrificio se exploró diariamente a los animales en busca de signos de dolor relacionados con el crecimiento de una masa tumoral, no apreciándose ni dolor a la palpación de la zona afectada, ni otros signos secundarios comportamentales como acalamiento, juego y ganancia de peso

(Figura 1). En todos los casos los animales se mostraron alertos y dispuestos a interactuar con el cuidador.

El peso de los animales fue registrado inmediatamente antes de la cirugía y, después, cada semana, observándose una ganancia de peso significativa y normal en animales de esta raza y sexo (Figura 1).

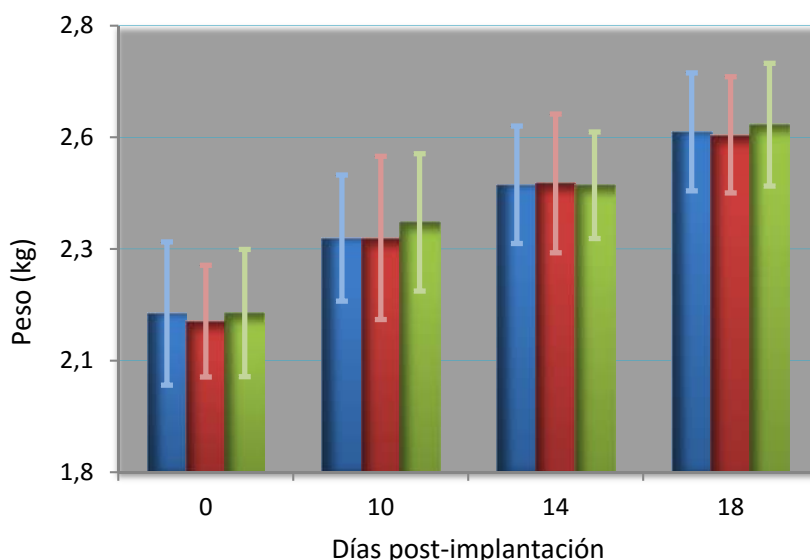


Figura 1. Evolución del peso corporal de los animales a lo largo del estudio (media \pm desviación estándar) en músculo (azul), hígado (rojo) y riñón (verde).

Controles ecográficos

En el primer control ecográfico, realizado a los 10 días post-implantación, solo se consiguió detectar con certeza el tumor en 4 de los 9 animales, observándose un nódulo ecogénico en la localización del implante celular, compatible con una neoplasia, de un diámetro aproximado de 0,5 cm (Figura 2).

Es en el control ecográfico del día 14 post-implantación cuando detectamos con seguridad en todos los animales del estudio la presencia de una masa ecogénica y homogénea, de bordes definidos por un halo hipoecoico y sin una cápsula definida. Dicha masa es compatible con la presencia de una neoplasia y de un tamaño de $0,8 \pm 0,2$ cm de diámetro, independientemente de su localización en hígado, riñón o músculo. El halo hipoecoico es compatible con una respuesta inflamatoria del organismo frente a la masa. No se detectó la presencia de neovascularización, evaluada mediante Doppler pulsado. En uno de los animales implantados en

riñón se observó como la masa comienza a protruir desde el parénquima renal hacia la cavidad abdominal (Figura 3).

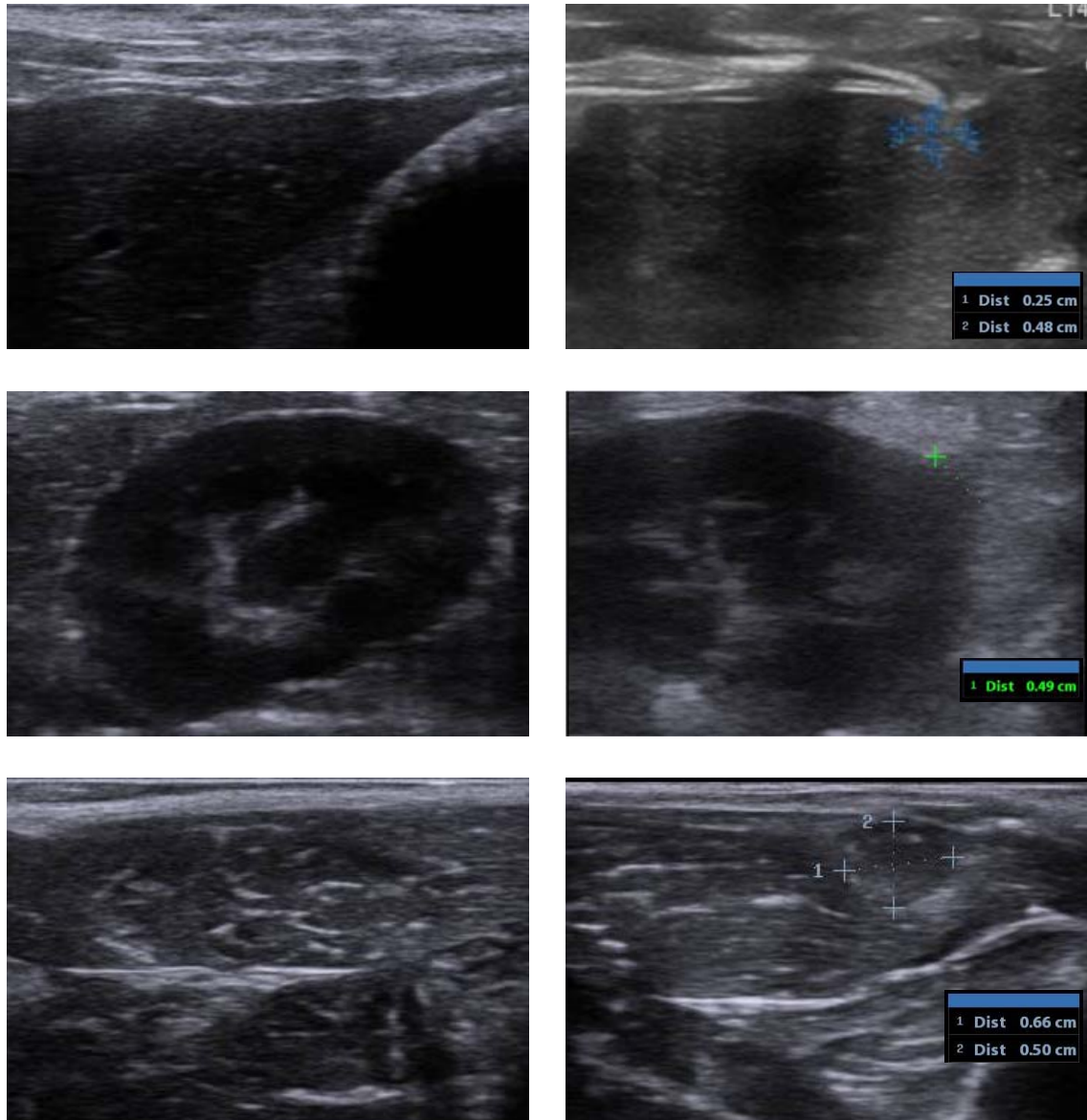


Figura 2. Imágenes ecográficas obtenidas en hígado (arriba), riñón (centro) y músculo (abajo) antes de la implantación (derecha) y a los 10 post-implantación (izquierda).

Durante la ecografía realizada el día 17 (Figura 3) se observó una masa ecogénica, esférica o ligeramente elipsoidal, con un tamaño de $1,2 \pm 0,3$ cm de diámetro independientemente de su localización, compatible con un tumor de gran malignidad, evidenciado por su alta velocidad de crecimiento e infiltración de tejido adyacente. En las tres localizaciones se observó la aparición en el interior de la masa de zonas hipocogénicas, de tamaño variable, compatibles

con la presencia de necrosis intratumoral debido al rápido crecimiento del tumor. Esta observación fue especialmente evidente en los tumores hepáticos. También se estudió por Doppler pulsado la presencia de neovascularización tumoral específica, detectándose zonas de intensa vascularización tanto en el interior de la masa como en sus zonas periféricas.

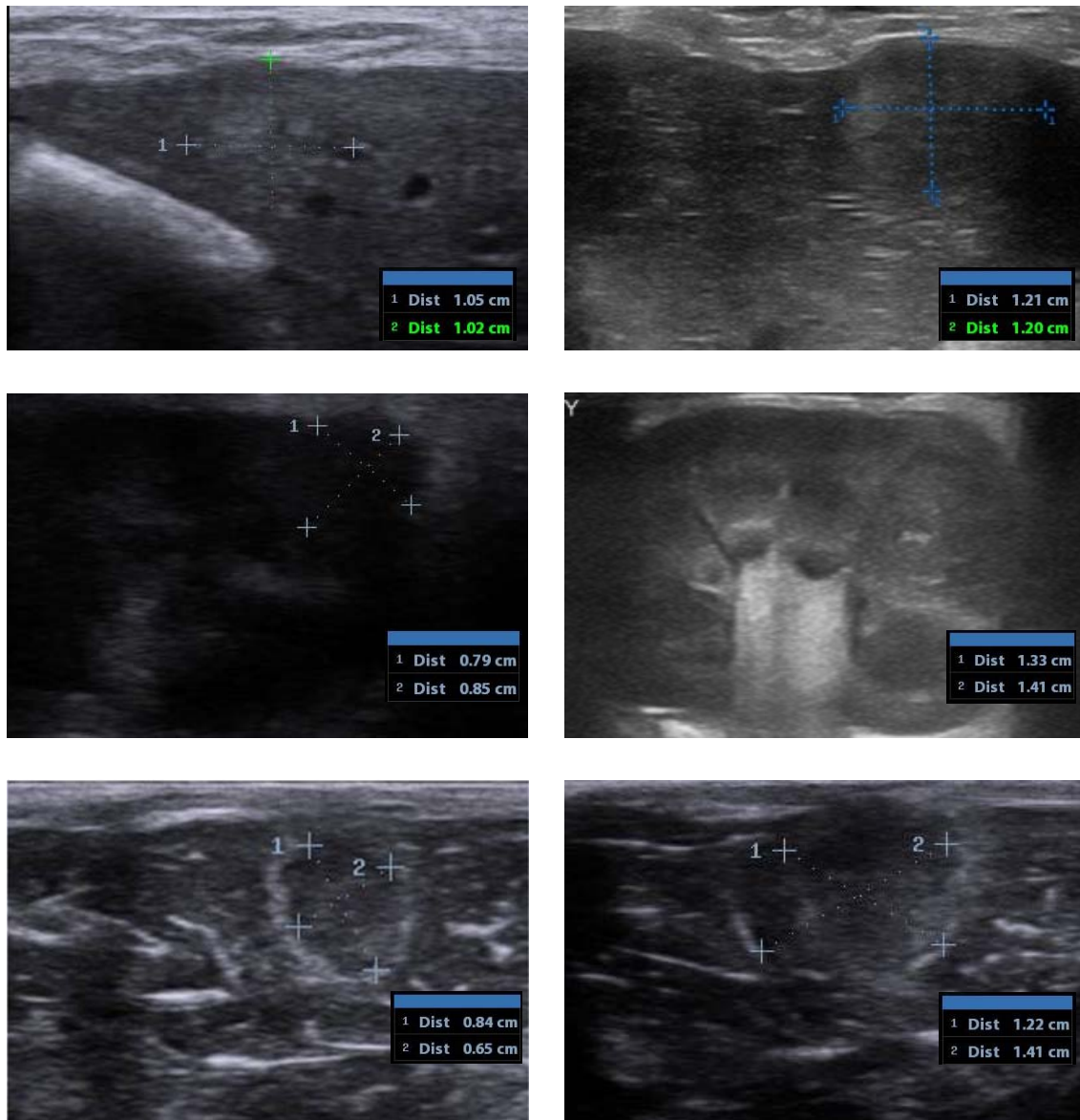


Figura 3. Imágenes ecográficas obtenidas en hígado (arriba), riñón (centro) y músculo (abajo) a los 14 (derecha) y 18 días post-implantación (izquierda).

Dado que no se detectaron diferencias ecográficas en cuanto al tamaño ni a la velocidad de crecimiento de la masa, se optó por agrupar los resultados en una sola figura en la que se puede apreciar como el tamaño parece aumentar de forma exponencial en función del tiempo transcurrido tras la implantación quirúrgica del fragmento tumoral.

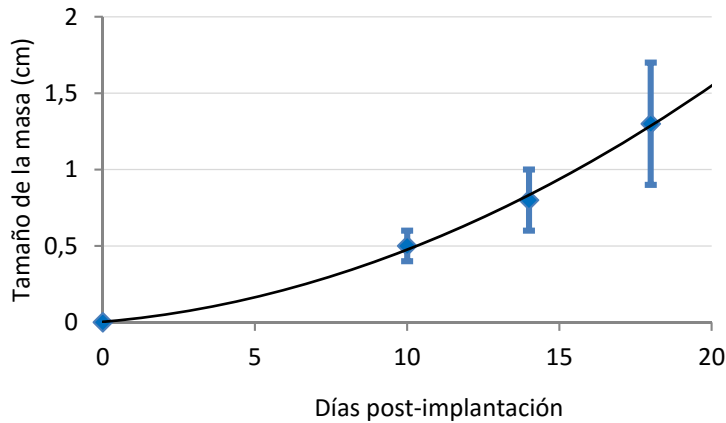


Figura 4. Progresión del tamaño ecográfico de la masa compatible con el tumor (media \pm desviación estándar) de las medidas realizadas los días 10, 14 y 18. La línea sólida representa una estimación de la tendencia exponencial del crecimiento del tumor.

Analíticas sanguíneas

Los parámetros del hemograma y la bioquímica general, destinados a evaluar las repercusiones sistémicas del tumor no revelaron diferencias significativas al comparar los valores obtenidos en las muestras de sangre tomadas antes de la implantación con los obtenidos a los 18 días post-implantación.

Necropsia

Los animales fueron sacrificados el día 18 post-implantación, tras la realización de un control ecográfico, momento que se consideró idóneo para la obtención de muestras. Se contrastó que el tamaño y la localización de los tumores coincidía con el de las masas observadas ecográficamente (Figura 5), se realizaron medidas de la masa en dos ejes para cuantificar su volumen y se enviaron al laboratorio para su posterior análisis anatomopatológico.

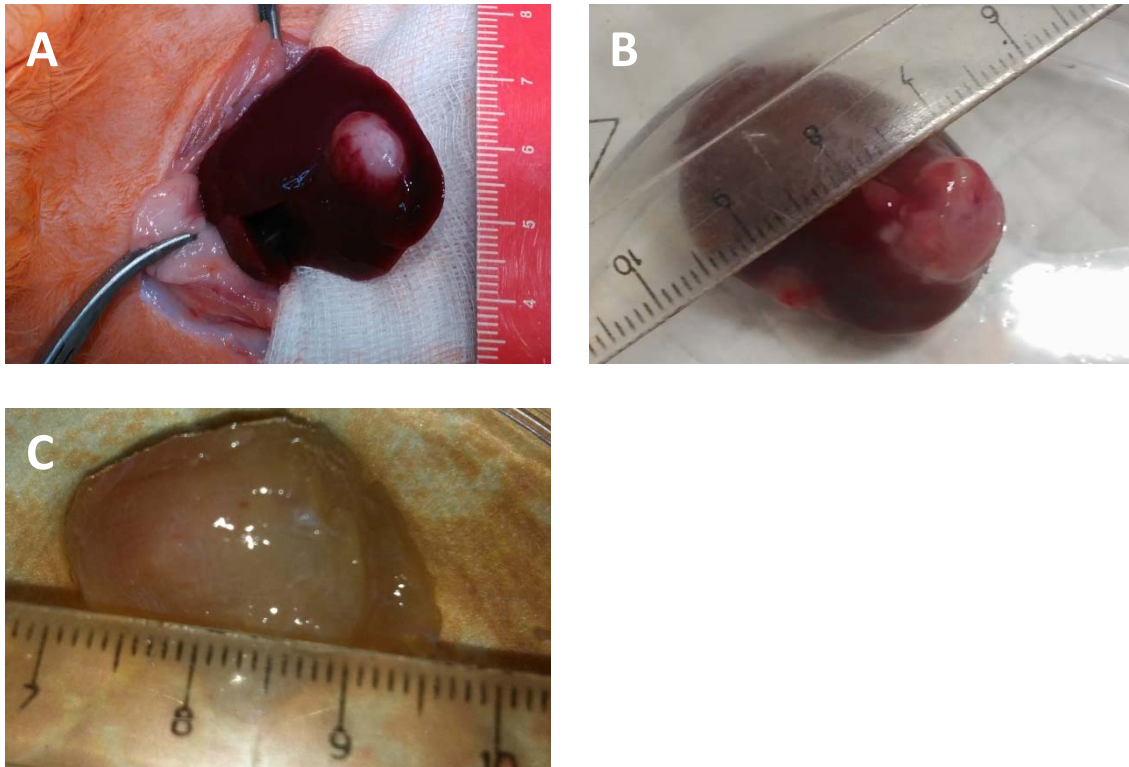


Figura 5. Imágenes de las masas tumorales en (A) hígado, (B) riñón y (C) músculo, obtenidas durante la necropsia.

Durante la necropsia, se realizó una evaluación general de los animales, no observándose otras lesiones macroscópicas remarcables a parte del citado tumor. En ninguno de ellos se encontraron indicios de metástasis.

Tinción histológica con Hematoxilina-Eosina

La caracterización anatomopatológica de los tumores obtenidos en el estudio reveló características de los mismos típicas de los carcinomas. A pocos aumentos se observó, en la periferia, una zona de proliferación activa del tumor con gran condensación de estructuras, mientras que, por el contrario, en el centro del mismo se observaron zonas poco teñidas compatibles con áreas de necrosis intratumoral (Figura 6A). En la zona de transición entre el tejido sano y la masa en crecimiento se apreció una banda muy basófila, con gran condensación de células inflamatorias acompañadas de células tumorales proliferativas y en diferentes estados de degradación, correspondiendo a la zona donde la neoplasia está siendo atacada por el sistema inmune del animal.

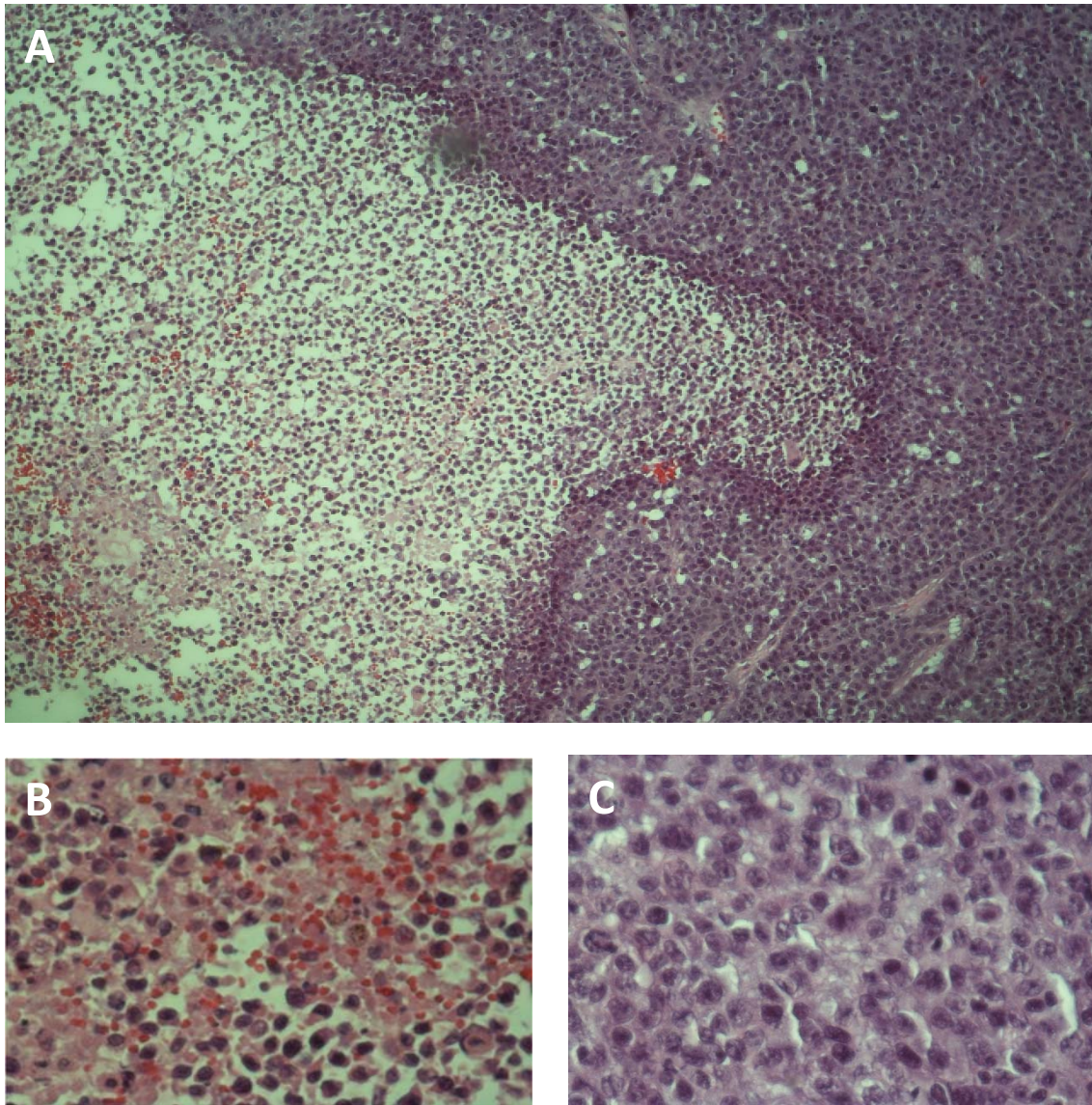


Figura 6. Tinción con H&E del carcinoma de células escamosas obtenido tras la necropsia. (A) A la izquierda de la imagen la zona de necrosis con la característica “imagen fantasma” y a la derecha la zona de proliferación activa del tumor (10x) B) Zona de necrosis (60x). C) Zona de proliferación tumoral (60x).

Al observar el tumor con mayores aumentos, la tinción convencional con H&E permitió observar la presencia de células basófilas con grandes núcleos hiper cromáticos, de morfología y tamaño variables y escaso citoplasma, lo cual es compatible con un escaso grado de diferenciación celular (Figura 6C). Se observaron zonas de gran condensación celular, con células de aspecto más o menos homogéneo, pero con importantes atipias celulares (núcleos gigantes, gran cantidad de mitosis y mitosis atípicas).

Estas zonas de gran celularidad se alternan con zonas de necrosis, en las cuales se observó una gran desestructuración celular, con alteración y degeneración citoplasmática, así como restos

nucleares y restos citoplásmicos libres, dando lugar a la característica “imagen fantasma”, propia de los tejidos necrosados (Figura 6B). También se encontraron algunas células parenquimatosas degeneradas, e incluso zonas en las que se apreciaban fibras conjuntivas, lo que se correspondería a una típica imagen de cicatrización, posiblemente estimulada, de forma indirecta, por la liberación de factores tumorales relacionados con el crecimiento tumoral y la angiogénesis. Es particularmente significativa la observación de que, en el interior del tumor, las zonas donde se puede observar una mayor proliferación y condensación de células malignas, se encuentran formando islas bien delimitadas en las que, en la mayor parte de los casos, se puede observar la presencia de una arteriola central.

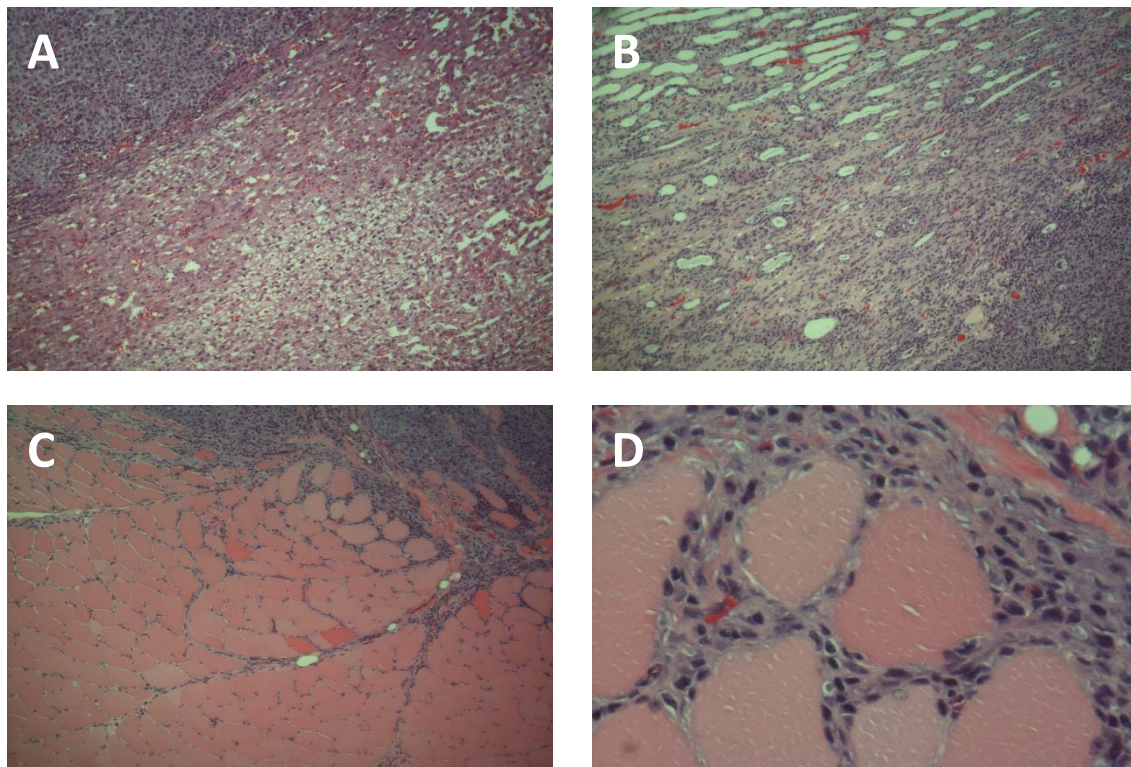


Figura 7. Zonas de invasión tumoral de tejido sano. A) Zona de invasión en hígado (10x). B) Zona de invasión de la médula renal (10x). C (10x) y D)(60x) Zona de invasión en músculo.

En las muestras de hígado observamos una clara delimitación entre las células carcinomatosas y el parénquima hepático, así como un evidente aplanamiento de los hepatocitos más cercanos a la zona de proliferación tumoral, lo que sugiere una compresión del parénquima del órgano debido al crecimiento del tumor de tipo predominantemente expansivo (coincidente con el aspecto macroscópico de la lesión), algo que resulta llamativo en un tumor de estas

características y con este grado de malignidad, en el que cabría esperar un crecimiento de tipo invasivo (Figura 7A).

En riñón la delimitación de la masa resultó algo más complicada. Observamos una zona de transición difusa, donde encontramos células tumorales aisladas o agrupadas en clusters, rodeadas de gran cantidad de material eosinofílico, compatible con líquido citoplasmático procedente de la destrucción tisular (Figura 7B). Dicha zona de transición es más amplia en la zona medular que en la cortical, lo cual podría indicar que el ambiente hiperosmótico de esta región desempeña un papel importante acelerando la destrucción de tejido sano y reduciendo el ritmo de crecimiento tumoral. Si avanzamos hacia tejido sano observamos los túbulos renales de aspecto tortuoso en los lugares próximos a los lugares de invasión, lo cual evidencia el inicio de su degeneración.

En músculo, sin embargo, el carcinoma presenta un crecimiento mucho más invasivo, las células tumorales avanzan a través del perimio, es decir, las bandas de tejido conjuntivo fibroso que se encuentran rodeando los fascículos de fibras musculares, acompañadas de un gran número de células inflamatorias, provocando una fascitis eosinofílica. Posteriormente discurren a través de los endomisios, que envuelven a cada fibra muscular, y de esta forma rodean a dichas estructuras provocando su degeneración (Figura 7C y 7D).

Tinciones inmunohistoquímicas

Para una caracterización más detallada de la estirpe celular y un conocimiento más profundo del modo de invasión del tumor se realizaron una serie de tinciones específicas.

Se realizó la *tinción CK34β E12* en la que se emplearon anticuerpos específicos para teñir esta citoqueratina de alto peso molecular, una proteína específica del citoesqueleto de la estirpe epitelial sobreexpresada en algunos carcinomas de estirpe epitelial. En la zona de proliferación se observó el crecimiento anárquico de las células epiteliales, entre las que se detectaron la presencia de algunas células inmunitarias aisladas no teñidas (Figura 8B). La respuesta inmunitaria del huésped es muy evidente en la zona de transición entre la neoplasia y las zonas de necrosis, donde se observó una banda ancha de células de citoplasma no teñido que se corresponden con las células defensivas del organismo que están atacando al tumor (Figura 8A). Por último, en la zona de necrosis se observó claramente una tinción difusa y excesiva, propiciada por la destrucción de células tumorales y la consecuente desestructuración, liberación y difusión citoplasmática de la citoqueratina (Figura 8A).

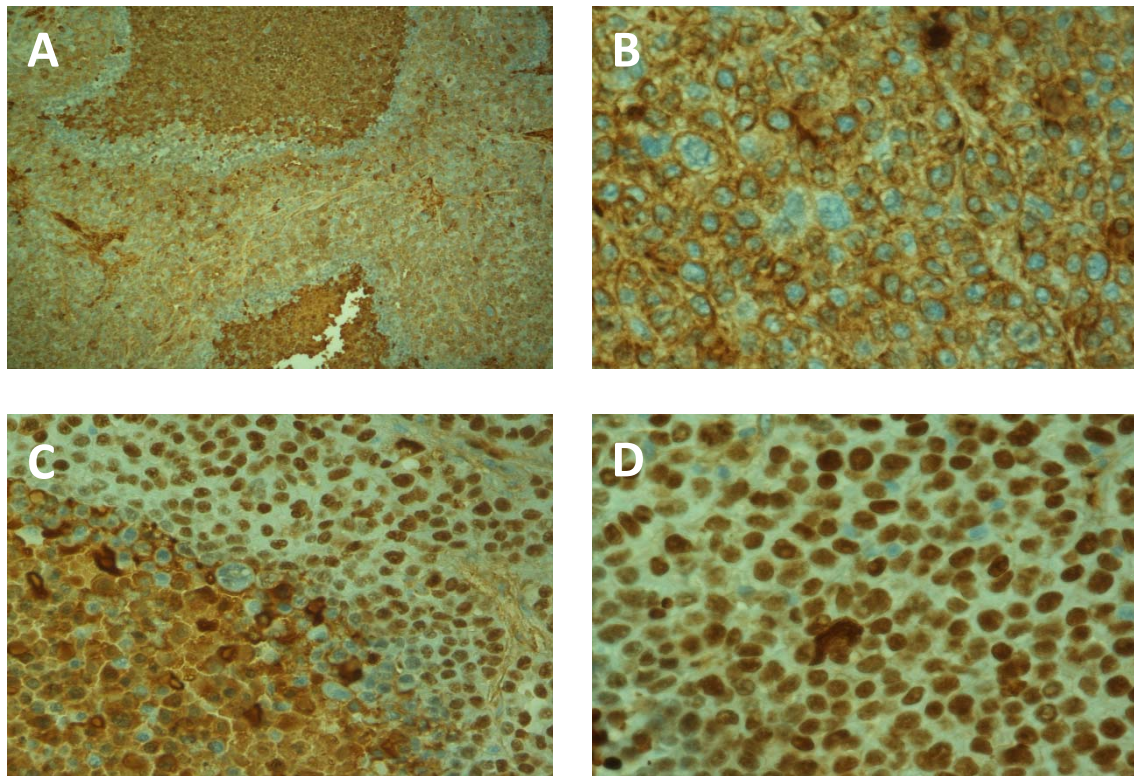


Figura 8. Marcaje inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-CK34β E12 (paneles A (10x) y B (60x)) y para el anticuerpo anti-p63 (paneles C y D (60x)).

También se realizó una *tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-p63* (Figura 8), factor de transcripción nuclear específico de las células epiteliales sobrepresado con frecuencia en tumores de células escamosas y cuyos epítomos son más resistentes a los procesos de fijación con formol que los epítomos de las citoqueratínas. Por lo tanto, con esta tinción completamos la información que nos aportan las proteínas del citoesqueleto, al mismo tiempo que aseguramos un doble marcaje positivo para las células tumorales. En los cortes marcados con este anticuerpo se observaron células con núcleos de morfologías variadas, con gran actividad mitótica y un número considerable de atipias nucleares en la zona de proliferación de la neoplasia al mismo tiempo que un marcaje difuso en la zona de necrosis originada por la destrucción celular (Figura 8C y 8D). Las células inmunitarias no se marcaron con este anticuerpo, delimitando nuevamente la zona de ataque del organismo.



Figura 9. Marcaje inmunohistoquímico para el anticuerpo HEP-PAR1 clon OCH 1E5. Marcador específico de hepatocitos (10x.)

Por último, se realizó una tinción específica de hepatocitos (HEP-PAR1 clon OCH 1E5) que permitió el marcaje del citoplasma y la membrana de las células hepáticas, diferenciándolas claramente de las células tumorales, las cuales se muestran negativas (Figura 9) y obteniendo así una contramarcage con respecto a la masa tumoral. Esta tinción permitió confirmar la compresión producida por el tumor en las zonas de parénquima adyacentes al área de invasión, en las que se observó que los hepatocitos se encuentran aplanados y con más desestructurados que en las zonas de parénquima más alejadas de la neoplasia.

DISCUSIÓN

Los tumores VX2 son carcinomas de células escamosas con un alto grado de malignidad³. Se trata de un tumor de rápido crecimiento y gran capacidad de invasión tisular, con un elevado poder de diseminación hematológica y linfática y una considerable letalidad⁴. Estas características provocan que la selección del momento óptimo para comenzar con los distintos protocolos terapéuticos sea todo un desafío¹³.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son acordes con los trabajos previamente publicados sobre el crecimiento y las características anatómicas e inmunohistoquímicas de los carcinomas creados tras la implantación de células VX2^{2,4,16}.

La eutanasia en el día 18 post-implantación se decidió en base a los resultados de trabajos anteriores publicados¹³ y al seguimiento diario de nuestros animales, ya que en ese momento el tamaño del tumor reunía características adecuadas para permitir la evaluación de la acción de nuevos tratamientos quimioterápicos. Por otra parte, mantener a los animales con vida durante un periodo de tiempo más prolongado hubiese aportado información sobre la aparición de posibles metástasis y su localización, aparición de sintomatología sistémica propias del síndrome paraneoplásico, letalidad del tumor, todos ellos datos de indudable valor en el pronóstico clínico del tumor. Sin embargo, este no fue en ningún caso el objetivo de nuestro trabajo ya que el modelo propuesto debe servir como base para demostrar la eficacia de nuevas formas de vehiculización de moléculas cuyo mecanismo de acción es bien conocido.

En concordancia con el rápido aumento del diámetro y el volumen tumoral, la mayor parte de los autores describen un crecimiento de la masa carcinomatosa de unos 2 cm de diámetro al cabo de 3 a 4 semanas^{4,15}, dato que coincide con lo estimado en nuestros animales de haber continuado con el experimento. No obstante, en algunos de nuestros ejemplares se observó un crecimiento tumoral aún más rápido, lo que hace imprescindible el seguimiento ecográfico de la masa para poder determinar con exactitud el momento óptimo en el que realizar los ensayos antineoplásicos⁵. Sin embargo, creemos que esta variación en la velocidad de crecimiento podría ser debida a variaciones en el lugar de implantación y diferencias en los protocolos postoperatorios, más que a variaciones en la capacidad de proliferación celular propia del tumor, dado que los resultados obtenidos por los marcadores de proliferación son muy similares a los publicados¹².

Por otra parte, la existencia de vascularización peritumoral apreciada en ciertos animales a partir de la segunda semana de ensayo, es un factor crucial para la futura evaluación de protocolos de tratamiento antineoplásico^{10,13} por métodos de embolización transarterial, quimio-ablación y otras técnicas que impliquen la dispensación localizada de fármacos y/o partículas a través de cánulas intra-arteriales o de vehiculización con nuevos transportadores de diseño. Un ejemplo de ello sería la utilización de nanopartículas que, específicamente, se encarguen de dirigir y focalizar la acción del fármaco hacia la diana tumoral. En este sentido, las nanopartículas representan una nueva forma de administración de fármacos antitumorales clásicos que evita en gran medida la presentación de efectos indeseables sistémicos, si bien para ello necesitan una vía específica de acceso hasta la masa tumoral.

Un dato significativo a tener en cuenta es la tasa de éxito tras la implantación. La bibliografía recoge una tasa de éxito en torno al 80% de los animales¹⁶, sin embargo, en nuestro caso esta tasa fue del 100%. Es evidente que en nuestro caso se utilizaron un bajo número de animales y que, por tanto, los datos tienen un menor significado estadístico. Sin embargo, y de acuerdo con la información recogida en el laboratorio de Farmacología sobre experimentos realizados en un lote mayor de animales (datos no publicados), la tasa de éxito se acerca al 99%. Es difícil poder sacar una conclusión cierta sobre estos resultados, pero es posible que los cuidados veterinarios refinados, la técnica quirúrgica, la estricta terapia postquirúrgica e incluso el manejo atento y amable que se les da a estos animales hayan desempeñado un papel positivo en este sentido. En cualquier caso, es importante remarcar la importancia y la necesidad de aplicar cuidados y atención estrictamente veterinaria cuando estos tienen como fin último la creación de un modelo de esta clase, más cuando entran en juego cuestiones de tipo estrictamente ético relacionados con el bienestar animal.

El análisis anatomopatológico de las muestras de los tumores mediante la tinción H&E, así como las distintas técnicas inmunohistoquímicas¹⁴ específicas llevadas a cabo, permitieron definir la organización celular de la neoplasia, así como el patrón de invasión tumoral, demostrando que, a partir de las dos semanas postimplantación, es el momento óptimo para llevar a cabo ensayos antineoplásicos⁹.

Las imágenes histológicas están en consonancia con el patrón de crecimiento tumoral descrito por otros autores⁷⁻⁸ en carcinomas de células escamosas, según el cual, la rápida y masiva proliferación celular no permite una angiogénesis acorde al grado de celularidad. Las células más alejadas de los vasos sufren un proceso de hipoxia y degeneran, como evidencian las

grandes áreas de necrosis en las zonas centrales del tumor y la presencia de pequeños vasos cercanos a las zonas de proliferación tumoral.

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones debido al diseño experimental. En primer lugar, el empleo de 3 animales por órgano diana nos da unos datos iniciales y orientativos ya que es un número relativamente pequeño. Además, dado que los animales se sacrificaron cuando el tumor alcanzaba un tamaño adecuado a nuestro propósito, no se pudo relacionar el grado de expresión de los marcadores tumorales con el pronóstico, el grado de supervivencia o la mortalidad de los animales objeto del estudio. Ambos hechos suponen un inconveniente a la hora de valorar el éxito terapéutico final de los protocolos antineoplásicos, por lo que consideramos que el estudio debería realizarse con más animales y extenderse en el tiempo, si se desean conseguir datos epidemiológicos representativos en este sentido.

Otra limitación que aparece en los modelos tumorales que emplean células VX2 es la aparición de una alta tasa de necrosis tumoral espontánea en el centro del mismo, debido a factores ya mencionados como la hipoxia celular producida por el rápido crecimiento de la neoplasia. Dicha tasa de necrosis puede afectar a la eficacia de los estudios antineoplásicos programados a partir de estos modelos. No obstante, se están desarrollando nuevas líneas de células VX2 modificadas capaces de sobreexpresar el factor de crecimiento del endotelio vascular, así como el receptor del factor de crecimiento epitelial (datos no publicados).

Nuestros resultados parecen indicar que, en nuestros modelos, la localización en la que se realiza el implante no desempeña un papel crucial en la velocidad de crecimiento del tumor. No hemos encontrado diferencias en cuanto al diámetro de la masa, si bien, las imágenes histológicas parecen evidenciar que las masas desarrolladas en músculo tienen un aspecto más compacto y menos necrótico que las observadas en hígado y riñón. Si bien el tejido muscular es capaz de recibir un aporte de oxígeno considerable cuando se enfrenta a retos metabólicos intensos, como el ejercicio físico, en estado de reposo es un tejido cuya vascularización es menor. En reposo, el flujo de sangre a través de los músculos esqueléticos varía entre 4 y 7 mililitros por cada 100 gramos de músculo. En cambio, durante un ejercicio muscular intenso este flujo sanguíneo puede aumentar hasta 20 veces, elevándose hasta 50 o 75 ml por 100 g de músculo. No obstante, no es de descartar que la localización tisular del tumor represente un factor de extrema importancia en cuanto a la teórica distribución de los fármacos antineoplásicos hasta su diana tumoral.

CONCLUSIONES

En nuestro estudio, hemos conseguido profundizar en el desarrollo de un modelo tumoral hepático, renal y muscular de una forma eficaz y reproducible en conejos inmunocompetentes de mediano tamaño. La tasa de éxito conseguida es del 100% de los animales analizados. Hemos enfatizado los cuidados postquirúrgicos de los animales enrolados en el estudio conscientes de que son un factor determinante en el éxito del experimento y por cuestiones éticas y de bienestar animal. El experimento abarca un período de 18 días y la proliferación tumoral presenta características anatómicas, vasculares, histológicas e inmunohistoquímicas adecuadas para llevar a cabo futuras valoraciones de protocolos antineoplásicos.

CONCLUSIONS

In our study, we have delved into the development of a reproducible hepatic, renal and muscular cancer model in immunocompetent rabbits. After surgical implantation of VX2 fragments a 100% success has been observed. Post-surgical cares have been emphasized, knowing that, probably, this represents a key factor for the experiment success and for ethical and animal-welfare issues. The experiment lasts for 18 days and the tumor proliferation shows appropriate anatomical, vascular, histological and immunohistochemical characteristics that allows for the future valuation of antineoplastic drugs or drug-carriers.

VALORACIÓN PERSONAL

El desarrollo del presente trabajo me ha permitido la profundización de mis conocimientos sobre oncología y experimentación animal, materias que suscitaban gran interés en mi desde que fueron cursadas.

Al ser un trabajo con un planteamiento tan complejo y multifactorial, ha implicado un gran esfuerzo personal de aprendizaje para poder sacar el máximo partido a todos los elementos del estudio. Una dedicación especial ha requerido la adquisición de competencias suficientes para afrontar con garantías de éxito la realización e interpretación de los controles ecográficos, así como el análisis anatómico-patológico de las muestras.

Otro aspecto relevante ha sido el descubrir los numerosos problemas que se plantean en la práctica experimental rutinaria y la planificación estratégica para abordar cada uno de ellos, a menudo mediante la toma de decisiones en equipo y, en casos más específicos, recurriendo a especialistas de la materia en cuestión.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas de las que debería acordarme en este pequeño apartado, desde familiares y amigos por los ánimos y las ayudas en cada momento de desánimo hasta los miembros del centro docente por su generosidad en dedicar su tiempo y material desinteresadamente.

En especial a la Doctora Arantza Vitoria, del Departamento de Patología Animal, por su paciencia para enseñar y su ayuda en la realización de los numerosos controles ecográficos realizados a los animales. Del mismo modo, al Doctor Lluís Luján, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal, por su inestimable colaboración en una materia tan complicada como la anatomía patológica, sin la que no hubiese sido posible el correcto análisis de las muestras. También al Doctor José Cebrián, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, por permitirme el acceso a su magnífico microscopio óptico con cámara integrada para la toma de las imágenes que figuran en el presente trabajo. Quiero hacer mención especial a la ayuda recibida por José Ignacio Rivera Pemán, técnico de laboratorio de Farmacología que ha participado activamente en todas las tareas relacionadas con el manejo de los animales.

Finalmente, mención especial merecen los doctores José Aramayona y María Jesús Muñoz, Profesores Titulares del Departamento de Farmacología y Farmacoterapia de la Facultad y codirectores del estudio, por su dedicación e implicación total en el proyecto, por sus ánimos y consejos, por los buenos momentos pasados trabajando, y también por los no tan buenos, y por confiar en mí desde el principio, poniendo en mis manos la responsabilidad de un trabajo de esta envergadura. Gracias de todo corazón.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Florento, L., Matias, R., Tuaño, E., Santiago, K., de la Cruz, F. y Tuazon, A. (2012). Comparison of Cytotoxic Activity of Anticancer Drugs against Various Human Tumor Cell Lines Using *In Vitro* Cell-Based Approach. *Int. J. Biomed. Sci.* 8(1): 76–80.
- 2) Galasko, CSB., Muckle, DS. Intrasarcolemmal proliferation of the VX2 carcinoma. (1974). *Br J Cancer.* 29(1), 59–65
- 3) Georges, E., Breitburd, F., Jibard, N., Orth, G. (1985). Two Shope Papillomavirus-Associated VX2 Carcinoma Cell Lines with Different Levels of Keratinocyte Differentiation and Transplantability. *J. Virol.* 55(1), 246-250.
- 4) Kreuter, K.A., El-Abbadi, N., Shbeeb, A., Tseng, L., Mahon, S.B., Narula, N., Burney, T., Colt, H., Brenner, M. (2008). Development of a Rabbit Pleural Cancer Model by Using VX2 Tumor. *Compar. Med. Am. Ass. Lab. An. Sci.* 58(3), 287-293.
- 5) Luo, W., Zhou, X., Zheng, X., He, G., Yu, M., Li, Q., Liu, Q. (2010). Role of Sonography for Implantation and Sequential Evaluation of a VX2 Rabbit Liver Tumor Model. *J. Ultrasound Med.* 29, 51–60.
- 6) Lee, K., Liapi, E., Buijs, M., Vossen, J., Hong, K., Georgiades, C., Geschwind J. (2009). Considerations for Implantation Site of VX2 Carcinoma into Rabbit Liver. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 20(1), 113-117.
- 7) Martínez, C., Buys, DLJ. , Salgueiro, R. , Paredes, J. , Marina JM. , Zonana, E., Zarate A. (2008). Diagnóstico de foco microscópico de adenocarcinoma de la próstata; estudio morfológico e inmunohistoquímico de 143 casos. *Rev. Mex. Urol.* 68(2), 103-110.
- 8) Moinfar, F., Man, YG., Lininger, RA., Bodian, C., Tavassoli, FA. (1999) Use of keratin 35betaE12 as an adjunct in the diagnosis of mammary intraepithelial neoplasia-ductal type--benign and malignant intraductal proliferations. *Am. J. Surg. Pathol.* 23(9), 1048-58.
- 9) Motola-Kuba, D., Zamora-Valdés, D., Uribe, M., Méndez-Sánchez, N. (2006). Hepatocellular carcinoma. An overview. *Ann. Hepatol.* 5(1), 16-24.
- 10) Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in Cancer. *Vasc. Health Risk Manag.* 2(3), 213-219.
- 11) Parvinian, A., Casadaban, LC., Gaba RC. (2014) Development, growth, propagation, and angiographic utilization of the rabbit VX2 model of liver cancer: a pictorial primer and "how to" guide. *Diagn. Interv. Radiol.* 20(4), 335-40.
- 12) Reigosa, A., Fernández, A., Gutiérrez, D., Caleiras, E., Hardisson, D., Espig, H., Saldivia, F., Juarranz, A., Sanz, F. (2010). Expresión de p63 y citoqueratina 5/6 en los diferentes tipos moleculares del carcinoma de mama. *Rev. Esp. Patol.* 43(2), 79-85.

- 13) Sonoda, A., Nitta, N., Nitta-Seko, A., Ohta, S., Nagatani, Y., Mukaisho, K., Otani, H., Tsuchiya, K., Takahashi, M., Murata, K. (2011). Time-Course Studies of Implanted Rabbit VX2 Liver Tumors to Identify the Appropriate Time for Starting Hepatic Arterial Embolization in Animal Models. *Oncol.* 80, 92-96.
- 14) Torres, I. (2003). Marcadores Inmunohistoquímicos. Moleculares útiles en el diagnóstico. Pronóstico del cancer prostático. Madrid. Congreso Nacional de la S.E.A.P.
- 15) Yoon, SK., Cheol, J., Han, J., Young, J., Jin, K., Jung, S., Chan, H., Cheol, D., Hee, S. (2009). Radiofrequency Ablation of Renal VX2 Tumors with and without Renal Artery Occlusion in a Rabbit Model: Feasibility, Therapeutic Efficacy, and Safety. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 32, 1241–1246.
- 16) Wang, Z., Yang, G., Nie, P., Fu, J., Wang, X., Liu, D. (2013). Dynamical Observation on Biological Progression of VX2 Liver Tumors to Identify the Optimal Time for Intervention in Animal Models. *PlosOne* 8(8): e74327.

PROTOCOLO IMPLANTACIÓN:

- OBSERVACION DEL ANIMAL
- PESADO
- TOMA DE SANGRE COAGULACIÓN CENTRIFUGADO
- TOMA DE TEMPERATURA
- SEDACION
- ANESTESIA
- RASURADO
- DESINFECCIÓN
- VIA IV
- CIRUGIA
- TOMA DE TEMPERATURA
- MEDICACION
- OBSERVACION HASTA RECUPERACION

IMPLANTACIÓN

NUMERO CONEJO: JAULA:

FECHA:

CIRUJANO: ANESTESISTA:

LOCALIZACIÓN DEL IMPLANTE

hígado	<input type="text"/>
músculo	<input type="text"/>
riñón	<input type="text"/>

PESO: gramos

TEMPERATURA: °C

Estado del animal (signos clínicos detectados):

MEDICACIÓN, Sedación y anestesia

	Fármaco	Vía	Frecuencia	Dosis	Preparada (Si/No)	Administrada (Si/No)
Pre-operatorio	Medetomidina					
Pre-operatorio	Ketamina					
Pre-operatorio	Butorfanol					
Cirugía	Lidocaina					
Post-operatorio	Butorfanol					
Post-operatorio	Enrofloxacin					
RESCATE	Ketamina					
	Pentobarbital					